

**Untersuchungen zum Nachweis von  
Phosphorylierungen an Proteinen und Peptiden mit  
Eisen(III)-(N-ethyliminodiessigsäure-N'-fluorescein-thioharnstoff)**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

**D i s s e r t a t i o n**

von Adrian Klein  
aus Karlsruhe

1. Referentin: Dr. habil. Ursula Bilitewski  
2. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland  
Eingereicht am: 07.09.2000  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.12.2000  
Druckjahr: 2001

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin/Betreuerin der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeitrag:**

Klein-A, Sztajer-H, Sacht-G, Bilitewski-U, Flohé-L; Regeneration of kinase activity of the type 1 IL-1 Receptor-complex after SDS-PAGE; 1996; Poster auf dem IV. KBF-Symposium 'Molecular targets for drug development' in Braunschweig

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich meiner Arbeitsgruppe danken, weil sie stets ein wichtiger Rückhalt war. Ohne den ständig möglichen Gedankenaustausch, die gemeinsamen Pausen und Hilfen wäre die Zeit nicht halb so wertvoll gewesen! Danke Dr. Torsten Ziegler, Birgit von Tiedemann (viel Erfolg in Schottland!), Dr. Matthias Stiene, Christine Standfuß-Gabisch, Jens Schumacher (ein sehr herzlicher Extradank vor allem für die hervorragende Korrekturarbeit !), Dr. Anja Schmidt, Henning Schillig (dem ich eine wunderbare Zeit nach der GBF wünsche!), Jessica Schaumburg, Dr. Ingrid Rohm, Dr. Tanja Richter (viel Erfolg in Schottland!), Renate Kast, Björn Henze, Jörg Henkel, Detlef Hanisch, Dr. Alexander Günther, Dr. Meike Genrich, Carola Fortmann, Dr. habil. Ursula Bilitewski, Claudia Bebbler, Akin Akkoyun und ganz speziell dem unersetzlichen, leider ausgewanderten Dr. Dirk Kuhlmeier !!!

Dr. habil. Ursula Bilitewski möchte ich zudem noch als Betreuerin und Referentin meiner Arbeit besonders danken für viel Geduld und Rat.

Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich nicht nur für die freundliche Übernahme des zweiten Referates, sondern auch für die Bereitstellung seines Labors für die Arbeiten mit der 2D-Gelelektrophorese.

Prof. Dr. Uwe Panten danke ich im voraus dafür, daß er sich als dritter Prüfer für die Disputation zur Verfügung stellt.

Prof. Dr. Flohé, Dr. Gudrun Sacht, Claudia Wylegalla und ganz besonders Dr. Helena Sztajer danke ich sehr herzlich für die aufopfernde Unterstützung bei den Arbeiten mit Interleukin-1.

Herrn Prof. Dr. Mahavir Singh danke ich für die Bereitstellung des IL-1-Vektors.

Dr. Ronald Frank, Dr. Werner Tegge und Susanne Daenicke danke sehr ich für die Bereitstellung der Peptidmembranen und die Bereitschaft zur Diskussion.

Dr. Rainer Gast gilt mein ganz besonderer Dank für die Bereitstellung des Farbstoffes und die sehr hilfreichen Informationen und Diskussionen.

Dr. Mario Köster danke ich dafür, daß ich mit seiner Unterstützung mit der Fluoreszenzkamera arbeiten durfte.



Dr. Jörn Glöckler möchte ich auch ganz herzlich danken, besonders, da er mir ermöglicht hat, mit dem Farbstoff zu arbeiten.

Dr. Josef Wissing und Dr. Sabina Heim zählten nicht nur zeitweise zu meinen Arbeitsgruppenkollegen, sondern waren mir darüber hinaus sehr wertvolle Ratgeber und Mitarbeiter, denen ich noch einen Extradank aussprechen möchte.

Für die Hilfe bei der Fermentation der EL-4-Zellen danke ich den Mitarbeitern der Zellkulturtechnik. Erwähnen möchte ich dabei besonders Dr. Stephanos Grammatikos, Dr. Roland Wagner, Dr. Volker Jäger, Anja Kobold, Herbert Krafft und Maria Ebel.

Gleiches gilt für die Mitarbeiter der Bioverfahrenstechnik, die mir bei der Produktion des IL-1 sehr hilfreich waren. Hier sind insbesondere Dr. Jens Paulsen, Dr. Anton Roß, Hubert Zaczek und Burkhard Ebert zu nennen.

Dr. Hans-Jürgen Hecht möchte ich schließlich für die Modellierung des Farbstoffes (nicht gezeigt) danken.

Nicht zuletzt bin ich meiner lieben Familie sehr dankbar für einfach alles: meinen Eltern (ohne Eure Unterstützung hätte gar nichts geklappt!), Großeltern und Brüdern aber auch ihren Freundinnen, meinen Tanten, Onkels und meiner Cousine!

Zuletzt möchte ich noch den Fußballern der GBF danken, weil die für viel Spaß gesorgt und vor allem die nötige sportliche Betätigung ermöglicht haben!

## Inhaltsangabe

	Seite
<b>Inhaltsangabe</b>	I
<b>Liste der verwendeten Geräte und Software</b>	VI
<b>Liste der verwendeten Chemikalien</b>	VII
<b>Verwendete Abkürzungen</b>	X
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Aufgabenstellung</b>	1
<b>1.2 Theoretische Hintergründe zur Aufgabenstellung</b>	1
<i>1.2.1 Proteomforschung</i>	1
<i>1.2.2 Signalleitung und Phosphorylierungen</i>	3
<i>1.2.3 Vergleich von Methoden zum Nachweis von Phosphorylierungen</i>	4
Chelate	7
<i>1.2.4 Interleukin-1</i>	9
Die Bedeutung von Interleukin-1 für den Organismus	9
Die Interleukin-1-Familie	10
Interleukin-1-Rezeptoren	12
IL-1-Rezeptor assoziierte Proteine	12
Weitere Interleukin-1-Signalwege	14
<i>1.2.5 EL-4-Zellen</i>	16
<b>1.3 Ziel und Aufgaben der Untersuchungen mit FIF</b>	17
<b>2. Methoden</b>	18
<b>2.1 Theoretische Hintergründe zu verwendeten Methoden</b>	18
<i>2.1.1 Elektrophorese</i>	18
<i>2.1.1.1 Gelelektrophorese</i>	18
2D-PAGE (zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese)	19
<i>2.1.1.2 Kapillarelektrophorese</i>	21
<i>2.1.1.3 Blotten</i>	22
<i>2.1.2 Sonstiges</i>	23
<i>2.1.2.1 Peptidmembranen</i>	23

2.1.2.2	<i>EDC-Reaktion</i>	23
<b>2.2</b>	<b>Entwicklung einer Färbemethode mit FIF für Membranen</b>	24
2.2.1	<i>Detektion der Färbung mit FIF</i>	24
2.2.2	<i>Modellproteine</i>	24
2.2.3	<i>Aufbringen der Proteine auf Membranen</i>	25
2.2.4	<i>Lichtschutz</i>	25
2.2.5	<i>Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin</i>	25
2.2.6	<i>Membranmaterial</i>	26
2.2.7	<i>Temperaturabhängigkeit</i>	26
2.2.8	<i>Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin und BSA</i>	26
2.2.9	<i>pH-Wert-Einfluß</i>	27
2.2.10	<i>Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration</i>	27
2.2.11	<i>Färben eines Blots mit den Modellproteinen</i>	28
<b>2.3</b>	<b>Kapillarelektrophorese</b>	29
<b>2.4</b>	<b>Produktion von Interleukin-1 mit dem E.coli-Stamm CAG pIL-1ß3</b>	29
2.4.1	<i>Silberfärbung für Phastgele</i>	31
<b>2.5</b>	<b>Arbeiten mit tierischen Zellen</b>	31
2.5.1	<i>Kulturmedien und Kulturbedingungen</i>	31
2.5.2	<i>Auftauen der Zellen</i>	32
2.5.3	<i>Pflege der Zellen</i>	32
2.5.4	<i>Zählen der Zellen</i>	32
2.5.5	<i>Einfrieren der Zellen</i>	33
2.5.6	<i>Produktion von EL-4 6.1 im Fermenter</i>	33
2.5.7	<i>Stimulierung der Zellen mit Interleukin-1</i>	34
2.5.8	<i>Verarbeitung der Zellernte zur Lagerung</i>	34
<b>2.6</b>	<b>Immunopräzipitation von IL-1RI und Kinaseassays</b>	34
2.6.1	<i>Immunopräzipitation</i>	34
2.6.2	<i>Optimieren der Antikörpermenge für die Immunopräzipitation</i>	35
2.6.3	<i>Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel</i>	36
<b>2.7</b>	<b>Erstellen und Färben von 2D-Gelen und -Blots</b>	37
2.7.1	<i>Markierung von Zellen mit <sup>33</sup>P</i>	37
2.7.2	<i>Probenaufarbeitung für 2D-Gele</i>	37
2.7.3	<i>Erste Dimension der 2D-PAGE:</i>	

---

<i>Isoelektrische Fokussierung (IEF)</i>	38
2.7.4 <i>Zweite Dimension der 2D-PAGE: SDS-PAGE</i>	38
2.7.5 <i>Blotten der 2D-Gele</i>	39
2.7.6 <i>Coomassie-Färbung</i>	39
2.7.7 <i>Silberfärbung</i>	40
2.7.8 <i>Indische-Tinte-Färbung (Membranfärbung)</i>	40
2.7.9 <i>FIF-Färbung</i>	40
2.8 <b>Färbung von Membranen nach Kinaseassays</b>	41
2.8.1 <i>Kinaseaktivität von IL-1RI-Immunopräzipitat auf Blot- und Peptidmembranen</i>	41
Sequenzen der Peptidspots der Kinasesubstratmembranen	43
2.8.2 <i>Färben von Kinasesubstratpeptiden auf Membranen mit FIF und INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP</i>	43
2.9 <b>Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen</b>	44
Auswertung der Bilder per Software	45
 3. <b>Ergebnisse</b>	 46
3.1 <b>Entwicklung einer Färbemethode für Membranen</b>	46
3.1.1 <i>Membranmaterial</i>	46
3.1.2 <i>Temperaturabhängigkeit</i>	47
3.1.3 <i>Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin und BSA</i>	49
3.1.4 <i>pH-Wert-Einfluß</i>	50
3.1.5 <i>Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration</i>	51
3.1.6 <i>Färben von Blots mit den Modellproteinen</i>	52
3.2 <b>Kapillarelektrophorese</b>	53
3.3 <b>Produktion von Interleukin-1 mit dem E.coli-Stamm CAG pIL-1ß3</b>	55
3.4 <b>Immunopräzipitation und Kinaseassays</b>	56
3.4.1 <i>Optimieren der Antikörpermenge für die Immunopräzipitation</i>	56
3.4.2 <i>Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel</i>	57
3.5 <b>Erstellen und Färben von 2D-Gelen und -Blots</b>	58
3.6 <b>Färbung von Membranen nach Kinaseassays</b>	60

3.6.1	<i>Kinaseaktivität von Immunopräzipitat auf Blot- und Peptidmembranen</i>	60
3.6.2	<i>Färben von Kinasesubstratpeptiden auf Membranen mit FIF und INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP</i>	61
3.7	<b>Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen</b>	62
4.	<b>Diskussion</b>	68
4.1	<b>Theorie zum Färbeverhalten von Eisen(III)-Iminodiessigsäure-Fluorescein (FIF) [Eisen(III)-(N-ethyliminodiessigsäure-N'-fluorescein-thioharnstoff)]</b>	68
	Potentielle Liganden von Fe(III)-IDA und grundsätzliche Bindungsumstände	69
	Neue Grundannahmen zur Theorie des Färbeverhaltens von FIF	71
	Zu III): Argumentation für einen Einfluß der Mikroumgebung	72
	Mit der Theorie zum Färbeverhalten von FIF erklärbare Phänomene aus der Literatur	74
	Die Behandlung mit EDC/Ethylendiamin	76
4.2	<b>Diskussion der Ergebnisse der Arbeit</b>	77
4.2.1	<i>Allgemeine Fehler bei der Entwicklung der Färbemethode</i>	77
4.2.2	<i>Membranmaterial</i>	77
4.2.3	<i>Temperaturabhängigkeit</i>	79
4.2.4	<i>Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin und BSA</i>	80
4.2.5	<i>pH-Wert-Einfluß</i>	82
4.2.6	<i>Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration</i>	83
4.2.7	<i>Färben eines Blots mit den Modellproteinen</i>	83
4.2.8	<i>Kapillarelektrophorese</i>	84
4.2.9	<i>Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel</i>	85
4.2.10	<i>Erstellen und Färben von 2D-Gelen und -Blots</i>	87
4.2.11	<i>Kinaseaktivität von Immunopräzipitat auf Blot- und Peptidmembranen</i>	88
4.2.12	<i>Färben von Kinasesubstratpeptiden auf Membranen mit FIF und INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP</i>	91
4.2.13	<i>Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen</i>	93
4.2.13.1	Peptidmembranen und Peptidauswahl	93

	Inhalt	V
4.2.13.2	Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen per Software	94
4.2.13.3	Allgemeines zur Färbung der Peptidmembranen (Hintergrund und Fehler)	94
4.2.13.4	Die Fluoreszenz der Peptide vor den Färbungen	96
4.2.13.5	Phosphopeptide	97
4.2.13.6	Nicht phosphorylierte Peptide	98
4.2.13.7	Fluoresceinfärbung der Peptide	98
4.2.13.8	Die Position der Phosphoaminosäure	99
4.2.13.9	Elution des FIF von den Peptidmembranen	100
4.2.13.10	Detektion bei einem höheren pH-Wert	100
4.2.13.11	Unterschiede der Peptide zu Proteinen	101
<b>4.3</b>	<b>Die Verwendbarkeiten von FIF und mögliche Verbesserungen</b>	101
4.3.1	<i>Die Verwendbarkeit von FIF für die Färbung von an Membranen immobilisierten Peptiden oder Proteinen</i>	101
4.3.2	<i>Die Verwendbarkeit von FIF für die CE</i>	103
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b>	105
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	107
6.1	<b>Struktur der verwendeten Aminosäuren</b>	107
6.2	<b>Liste der verwendeten Peptidsequenzen</b>	108
6.3	<b>Ergänzende Abbildungen</b>	114
	Anmerkung zu den Abbildungen 6.4 A bis 6.11 B	119
<b>Literatur</b>		120
<b>Lebenslauf</b>		127

## Material

Mikrokonzentratoren centricon 10, Amicon  
 J2-21 Centrifuge mit JA-10-Rotor, Beckmann  
 Optima TLX Ultracentrifuge, Beckman  
 Rotoren: TLA 100.4, Beckman  
           TLA 100.3, Beckman  
 Flüssigkeitsszintillationszähler BF Betaszint 5000, Berthold  
 BioFocus Capillary Electrophoresis System 2000, BioRad  
 Laser Induced Fluorescence Detektor, BioRad  
 Mini-PROTEAN II-Gelelektrophoreseapparatur, BioRad  
 Protean II Gelelektrophoreseapparatur, BioRad  
 Trans-Blot SD Semi-Dry Cell, BioRad  
 Glasgeräte, Duran und Schott  
 Centrifuge 5415 C, Eppendorf  
 Pipetten, Eppendorf  
 Thermomixer 5437, Eppendorf  
 Einweg-Kulturplastikgefäße, Falcon und Nunc  
 BAS 5000 Phosphor Imaging System, Fuji  
 Phosphoscreens, Fuji  
 Begasungseinheit mit pO<sub>2</sub>-Regler und Gasmischstation, GBF-Eigenbau  
 Quellkammer, GBF-Eigenbau  
 Wasserbad, GFL  
 15l - Fermenter, Giovanola Frères  
 Kühler, Haake  
 Heizrührer MR 2002, Heidolph  
 Cleanbenches, Heraeus  
 PC-Scanner, Hewlett Packard  
 Pipetus-akku, Hirschmann® Laborgeräte  
 Iso-Dalt Multiple Slab System Gelelektrophoreseapparatur, Hoefer  
 Schüttelinkubator INFORS HT, INFORS AG  
 Sauerstoffelektrode, Ingold, Urdorf, Schweiz  
 Filmentwickler Protec M45, INTAS  
 2,5l Doppelglasmanter, Karlsruher Glastechnisches Werk, Karlsruhe  
 Film X-omat AR, Kodak  
 Brutschrank, Labotec  
 150l - Fermenter, MBR  
 Trockenschrank ULE 400, Memmert  
 Kompaktthermostat MS3, Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen  
 Millipore-Q-Filtrationsanlage, Millipore  
 Zählkammer, Neubauer  
 Kameraobjektiv AF Nikkor, Nikon  
 Peristaltikpumpen Watson-Marlow 501 U/R, Petro Gas, Berlin  
 Elektrodenstreifen, Pharmacia  
 Multiphor II Gelelektrophoreseapparatur, Pharmacia  
 NAP-5- oder PD-10-Säule, Pharmacia  
 Novaspec II, Pharmacia

PhastSystem Gelelektrophoreseapparatur mit zugehöriger Färbeapparatur, Pharmacia  
 Power Supply - EPS 300, Pharmacia  
 Power Supply - EPS 1000, Pharmacia  
 CCD-Kamera LCU1, Photometrics  
 Phosphocellulose Units, SpinZyme™ Format, Pierce  
 Dark Box Darktop, Progress Control  
 Sartorius excellence Waage, Sartorius  
 Sartorius research Waage, Sartorius  
 Waage BP3100S, Sartorius  
 Autoklav, Sauter  
 pH.Meter CG822, Schott  
 Spectrofluorophotometer RF-5000 (mit DR-15), Shimadzu  
 Blotpapier QuickDraw™, SIGMA  
 Leitfähigkeitsgrenzwertschalter Vegator 4331, Vega, Schiltach  
 Blotpapier 3MM Chr, Whatman

### **Software:**

IPLab Spectrum 3.1, Signal Analytics Corp.  
 Phoretix Array Advanced Version 1.00, 1998, NonLinear Dynamics Ltd.  
 Photoshop 4.0, Adobe Systems Inc.  
 Corel WordPerfect Suite 8, Corel Corporation and Corel Corporation Ltd.  
 Microcal™ Origin™ 5.0, Microcal Software, Inc.  
 ChemWindow3, SoftShell International

### **Chemikalien:**

Alle Chemikalien sind, wenn nicht anders angegeben, p.A.

Adenosin-Triphosphat (ATP) : SIGMA  
 $\gamma$ -<sup>33</sup>P- und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-Adenosin-Triphosphat (ATP) und <sup>33</sup>P-Orthophosphat : Amersham  
 Agarose-IEF : Pharmacia  
 6-Aminohexansäure : SIGMA  
 Ammoniak : MERCK  
 Ammoniumpersulfat (APS) : SIGMA  
 Ampicillin : SIGMA  
 Anti-IL-1RI-Antikörper : Pharmingen  
 Bis/Acrylamid-Lösung : ROTH  
 Brij 97 : SIGMA  
 Bromphenolblau : SIGMA  
 Casein : SIGMA  
 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) : SIGMA  
 Citronensäure : SIGMA  
 Coomassie Brilliant Blue R-350 : SIGMA  
 Diaminobenzidin : SIGMA  
 Dimethylformamid : FLUKA  
 Dimethylsulfoxid (DMSO) : FLUKA



Dithiothreitol (DTT) : Amersham-Pharmacia  
Dulbecco's Modified Eagle Medium 41966 (DMEM) : Gibco BRL  
Essigsäure : MERCK  
Ethanol : MERCK  
Ethylendiamin-dihydrochlorid : SIGMA  
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) : SIGMA  
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC = EDAC) : SIGMA  
Fluorescein : SIGMA  
Formaldehyd : MERCK  
Fötales Kälberserum (FCS) : SIGMA  
Glucoseoxidase : Biozyme  
Glutaraldehyd : MERCK  
Glycerin : MERCK  
Glycin : MERCK  
Guanidin-Hydrochlorid : FLUKA  
Harnstoff : SIGMA  
HCl : MERCK  
Hefeextrakt : DIFCO  
N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES) : SIGMA  
Histon1 : Boehringer  
INDIA<sup>TM</sup>-PhosphoProbe-HRP : Pierce  
Indische Tinte : Pelikan  
Indolacrylsäure : SIGMA  
IPG-Streifen : Pharmacia  
Isopropanol : MERCK  
Kaliumchlorid : MERCK  
Leupeptin : SIGMA  
Lysozym : SIGMA  
Magnesiumchlorid : MERCK  
Manganchlorid : MERCK  
Methanol : MERCK  
Myelin Basic Protein : SIGMA  
Natriumacetat : SIGMA  
Natriumcarbonat : MERCK  
Natriumchlorid : MERCK  
Natriumhydrogencarbonat : MERCK  
Natriumlaurylsulfat (SDS) : SIGMA  
Natriumphosphat : SIGMA  
Natriumpyrophosphat : SIGMA  
Natriumthiosulfat : SIGMA  
Nickelchlorid : MERCK  
Nitrocellulose-Membran Hybond ECL : Amersham  
2-[N-morpholino]ethansulfonsäure (MES) : SIGMA  
3-[N-morpholino]propansulfonsäure (MOPS) : SIGMA  
Nylon-Membranen : SIGMA  
Ovalbumin : SIGMA

Paraffinöl : MERCK  
Pefablock : Boehringer  
Pharmalyte : Pharmacia  
Phosphocellulose-Unit : Pierce  
Phosvitin : SIGMA  
Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF) : SIGMA  
Protein G-Sepharose : SIGMA  
PVDF-Membran : SIGMA  
Radioaktivmarker [<sup>14</sup>C]methylierte Standardproteine : Amersham  
Rinderserumalbumin (BSA) : SIGMA  
SDS-Molekulargewichtsmarker Prestained broad range und LMW prestained : BioRad  
Serdolit MB-1 : SERVA  
Silbernitrat : SIGMA  
Sulfosalicylsäure : SIGMA  
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) : Pharmacia  
Thioharnstoff : SIGMA  
Trichloressigsäure : MERCK  
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris) : SIGMA  
Trypanblau : SIGMA  
Tryptone : DIFCO  
Tween 20 : SIGMA  
Wasserstoffperoxid : MERCK  
ZKT-1-Medium : GBF

## Abkürzungen

Gängige Abkürzungen für allgemein gültige Begriffe, physikalische Größen und SI-Einheiten (System International D'Unites) wurden nicht in das Abkürzungsverzeichnis aufgenommen.  
Die Buchstabenabkürzungen für Aminosäuren sind im Anhang angegeben.

Abb	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CCD	Charge coupled device
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylenediaminetetraacid (Ethyldiamintetraessigsäure)
EOF	Endosmotischer Fluß
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FIF	Fe(III)-Iminodiacetat-Fluorescein
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Good Manufacturing Practice
GOD	Glucoseoxidase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IDA	Iminodiacetate (Iminodiessigsäure)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
LMW	Low Molecular Weight (Niedermolekulares Gewicht)
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MBP	Myelin Basic Protein
MES	2-[N-morpholino]ethansulfonsäure
MOPS	3-[N-morpholino]propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular weight (Molekulargewicht)
NC	Nitrocellulose
NTA	Nitrilotriacetate
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphate Buffered Saline (Salzhaltiger Phosphatpuffer)
PC	Personal Computer
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethysulfonyl Fluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
TCA	Trichloracetate (Trichloressigsäure)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoracetate (Trifluoressigsäure)
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ZKT	Zellkulturtechnik (GBF-Arbeitsgruppe)

# 1. Einleitung

## 1.1 Aufgabenstellung

An der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig (GBF) wurde ein Reagenz für die Detektion von Phosphorylierungen an Proteinen und Peptiden entwickelt (Tegge-W et al. 1998), das die relative Spezifität der Bindung von Eisen(III)-Chelat an Phosphatgruppen mit einem Fluoreszenzfarbstoff kombiniert: das Eisen(III)-Iminodiessigsäure-Fluorescein (FIF). Die Anwendbarkeit von FIF für die Trennung von an Agarose-Beads synthetisierten Phosphopeptiden von nicht phosphorylierten Peptiden konnte von Gast-R 1999 gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendbarkeit des Farbstoffes für Westernblots (und damit auch für die Proteomforschung), Peptidmembranassays und die Kapillarelektrophorese untersucht werden.

Nach der Erarbeitung von Färbebedingungen mit wenigen Modellproteinen sollten mit einem Modellsystem Realproben gefärbt werden. Dafür wurde die frühe Signaltransduktion von Interleukin-1 bei der Zelllinie EL-4, einer Maus-T-Zelllinie, gewählt. Nach der Produktion von IL-1 und EL-4-Zellen wurden verschiedene Kinaseassays zum Test auf Eignung des Modellsystems und der Färbung durchgeführt.

Schließlich sollten weitere Experimente Aufschlüsse über die Spezifität und gegebenenfalls die Natur der Bindung des Moleküls bringen.

## 1.2 Theoretische Hintergründe zur Aufgabenstellung

### 1.2.1 Proteomforschung

Proteom ist ein Worthybrid, das die Verbindung von PROTEin und GenOM ausdrücken soll (Wilkins und Wasinger 1994). Es wird definiert als “das zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter exakt definierten Randbedingungen quantitativ ermittelte Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle, einer Organelle oder auch einer Körperflüssigkeit” (Lottspeich-F 1999).

Als Motivation für die Forschung am Proteom (englisch: *proteomics*) gelten einerseits der Fortschritt der Genomforschung und andererseits das, was diese nicht leisten kann. Immer mehr komplette Genomsequenzen werden veröffentlicht (Lottspeich-F 1999), und so werden immer mehr Daten über Gene erhalten, deren Funktionen nicht bekannt sind. Auch die Untersuchung der mRNA von Zellen (hier wird auch von Transkriptom gesprochen) reicht nicht aus, alle gewünschten Informationen zu

erhalten. Eine Schwierigkeit liegt darin, daß sich Genom, Transkriptom und Proteom nicht exakt entsprechen. Viele Modifikationen (z.B. Glykosylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen) und alternative Transkriptionen führen dazu, daß ein Proteom umfangreicher ist als das zugehörige Genom, in einer Zelllinie also mehr unterscheidbare Proteine vorliegen können als Gene.

Informationen über die Funktion von Proteinen, über Signalwege (siehe auch 1.2.2 Signalleitung), über die Lokalisation und Komplexbildung von Proteinen, über Modifikationen und über die Dynamik von Zellvorgängen lassen sich mit der Proteomforschung gewinnen. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der Aufklärung von Vorgängen während Krankheitsprozessen (Jungblut-PR et al. 1999, Anderson-NL und Anderson-NG 1998).

Die Werkzeuge zu diesem Forschungsgebiet greifen auf drei Ebenen:

(1) Als erstes gilt es, die bis zu mehreren tausend Proteine einer zu untersuchenden Probe aufzutrennen. Die mit Abstand höchste Auflösung liefert die 1975 von O'Farrell vorgestellte Version der zweidimensionalen Gelelektrophorese (siehe 2.1.1.1). Mit ihr gelang es Klose-J und Kobalz-U (1995), 10000 Proteine einer Mauszelllinie aufzutrennen. Chromatographische Techniken und die Kapillarelektrophorese (siehe auch 2.1.1.2) können mit dieser Größenordnung zumindest derzeit nicht konkurrieren.

(2) Der zweite Aufgabenbereich besteht darin, die getrennten Proteine zu analysieren. Dazu werden sie in der Regel gefärbt (neben der Silberfärbung und Radioaktivmarkierungen werden vor allem Coomassie Blau angewendet sowie mittlerweile auch Fluoreszenzfarbstoffe). Ist eine Identifizierung notwendig, stehen vor allem die Methoden der Massenspektrometrie zur Verfügung. Sie ergänzen die älteren, sehr zeitaufwendigen und weniger empfindlichen Sequenzierungsmethoden für Proteine (z.B. Edman-Abbau), die aber noch zur Analyse von Proteinmodifikationen und bei unidentifizierten Proteinen eingesetzt werden. Darüber hinaus bieten sich Ligandentechniken an, d.h. die Verwendung von Antikörpern oder anderer spezifisch bindender Moleküle. Mit diesen können Proteine an ihrer Gelposition (auf einer Blotmembran) gefärbt werden. Sind Proteine einmal identifiziert, können sie oft durch Standardproteinfärbemethoden aufgrund ihrer relativen Position im Gel nachgewiesen werden (siehe auch 1.2.3).

(3) Der dritte große Bereich umfaßt die sich rasant entwickelnde Bioinformatik. Bei der Verwaltung der Ergebnisse und Zusatzinformationen der Proteomforschung fallen große Datenmengen an (z.B. Gelauswertung, Datenbanken für 2D-Gele, Proteine, RNA-Expressionsdaten und DNA-Sequenzen, klinische Daten, etc.), was intelligente Software sowie große Speicherkapazitäten und Transferraten erfordert; hier liegt zur Zeit ein Entwicklungsschwerpunkt. Die Vernetzung von Datenbanken und

Forschungsinstitutionen, wie sie das Internet bietet, schafft Möglichkeiten, Forschungsergebnisse zu verbreiten und auszutauschen. Somit steigen Qualität, Geschwindigkeit und Komfort der Arbeit in diesem Bereich ständig weiter.

### ***1.2.2 Signalleitung und Phosphorylierungen***

Ein wichtiges Untersuchungsobjekt der Proteomforschung sind zelluläre Signalwege. Lebewesen sind organische Systeme, die auf die Dynamik ihrer Umwelt (z.B. auf pH-Wert-, Temperatur-, Lichtintensitäts-, Salzgehaltänderung etc.) und auf Nährstoffquellen oder Schadstoffe reagieren können müssen. Aufgrund der Komplexität von lebenden Organismen ist eine Koordination notwendig. Zellen, die sich vermehren, müssen ihr Wachstum regulieren, solche, die in enger Gemeinschaft mit anderen Zellen leben (in Geweben, Mycelen o.ä.), müssen zumindest mit benachbarten Zellen kommunizieren, um ihre Ernährung und ein koordiniertes Wachsen zu ermöglichen. In komplexeren Organismen, in denen eine regelrechte Aufgabenteilung von Zellen, beispielsweise organisiert durch Organbildung, vorliegt, muß überdies eine weitere Koordinationsmöglichkeit bestehen. Vorgänge wie Körperwachstum, Alterung, Immunabwehr etc. verlangen oft eine organismusweite Vernetzung von Informationen.

Die Aufnahme von Signalen kann z.B. durch Ladungs- und Potentialänderungen an Zellmembranen geschehen (i.d.R. unter Mitwirkung von Ionenkanälen), oder es sind spezifische Bindungsstellen (Rezeptoren) für Signalmoleküle vorhanden.

Das primäre Signal muß dann weitergeleitet und im Regelfall, da selten nur ein Reiz auf die Zelle einwirkt, verarbeitet werden, bevor es letztlich z.B. zu einer Änderung von Enzymaktivitäten oder der Genexpression kommt (Krauss-G 1997). Signalwege sind deshalb im allgemeinen Mehrschrittsysteme, die mit anderen Signalwegen verknüpft sind, und bei denen Signale verstärkt oder geschwächt und letztlich „verrechnet“ werden können.

Die Weitergabe eines Signals erfolgt entweder elektrisch oder chemisch. So kann aufgrund von Ladungsänderungen ein Potential weitergeleitet werden, es kann durch strukturelle Veränderungen eines beteiligten Moleküls zur Bindung eines weiteren Signalfaktors kommen, oder ein Protein kann chemisch modifiziert werden.

Unter den chemischen Modifikationen spielt das Anhängen bzw. Abspalten von Phosphatgruppen an bzw. von Proteinen eine wesentliche Rolle. Solche Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen sind unter physiologischen Bedingungen mit einer Ladungsänderung verbunden (im neutralen pH-

Bereich liegt in Abhängigkeit des pI-Wertes des betroffenen Proteins mindestens ein Sauerstoff der Gruppe deprotoniert vor (Cooper-JA 1991)). Zudem nimmt eine Phosphatgruppe deutlich mehr Raum ein als ein Proton (Johnson-LN und Barford-D 1993). So kommt es zu strukturellen Umbildungen und / oder zur Aktivierung bzw. Abschaltung von enzymatischen Aktivitäten. Für die Entdeckung der wesentlichen Rolle von Phosphorylierungen bei der Signalleitung erhielten Fischer-EH und Krebs-EG 1992 den Nobelpreis.

Enzyme, die Proteine phosphorylieren, heißen Proteinkinasen (Protein-phosphotransferasen), solche, die dephosphorylieren, Phosphatasen. Proteinkinasen sind in der Regel spezifischer für ihre Substrate als Phosphatasen. Es wird geschätzt, daß mehr als 10% aller Proteine einer Säugerzelle phosphoryliert werden (Alberts-B et al. 1995). Rund 90% der Proteinphosphorylierungen findet man an Serinresten. Phosphothreonin liegt mit einem Anteil von etwa 10% an zweiter Stelle und Phosphotyrosin mit Werten um 0,05% an dritter (Sefton-BM et al. 1980). Selten sind Histidin oder Cystein phosphoryliert.

### ***1.2.3 Vergleich von Methoden zum Nachweis von Phosphorylierungen***

Der Nachweis von Proteinphosphorylierungen ist ein wichtiges Mittel, um Signalwege aufzuklären sowie die Wirkung von Pharmaka zu ermitteln und kann z.B. auch genutzt werden, um die Unterschiede in den Signalwegen von gesunden Zellen und Krebszellen zu erforschen (Guy-GR et al. 1994). Standardmethode ist hier der Einsatz von radioaktivem Phosphor in Form von anorganischem Phosphat oder Adenosintriphosphat (ATP), Verwendung finden die Nuklide  $^{33}\text{P}$  und  $^{32}\text{P}$ . Die auf der einen Seite weniger intensive und damit auch weniger streuende Strahlung und die längere Halbwertszeit von  $^{33}\text{P}$  führt auf der anderen Seite zu längeren Expositionszeiten bzw. geringerer Empfindlichkeit als mit  $^{32}\text{P}$ ; darüber hinaus ist  $^{33}\text{P}$  teurer. Nachteil der Arbeit mit radioaktiven Materialien ist vor allem die potentiell schädigende Wirkung der Substanzen, die einen relativ hohen Schutzaufwand erfordert. Bei Arbeiten in vivo können lediglich die Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen nachgewiesen werden, die stattfinden, während das Nuklid in der lebenden Zelle in dem entsprechenden Pool der Phosphatquelle vorliegt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß Strahlung Zellen schaden und entsprechend reagieren lassen kann (deToledo-SM et al. 1998, Azzam-EI et al. 1998). In ungünstigen Fällen ist dann das Ergebnis eines Experiments vom Strahlungseffekt überlagert.

Bei Kinaseassays mit radioaktivem ATP werden nur die bei dem Test phosphorylierten Proteine markiert. Das kann ein wesentlicher Vorteil sein, wenn nur diese von Interesse sind, weil der Hintergrund entfällt. Phosphataseassays sind dagegen schwieriger durchzuführen. Dafür müssen die



Proben zunächst radioaktiv durchmarkiert, dann der Test durchgeführt und anschließend die abnehmende Radioaktivität ausgewertet werden.

Phosphoserin und Phosphothreonin können durch Behandlung mit einer alkalischen Lösung in der Regel leicht hydrolysiert werden, Phosphotyrosin ist dagegen säurelabiler. Werden Radioaktivitätsnachweise vor und nach einer entsprechenden Behandlung vorgenommen, lassen sich diese Phosphoaminosäuren oft unterscheiden (Koz-LM et al. 1991).

Die hohe Empfindlichkeit des Nachweises ist der Hauptvorteil des Einsatzes der Radionuklide. Bei dem sogenannten Phosphorimaging werden radioaktive Proben auf spezielle Platten gelegt, die ionisierende Strahlung speichern können. Ein Phosphorimager besitzt einen Laserscanner, mit dem die bestrahlte Stelle zur Emission von Licht angeregt werden kann. Dieses wird schließlich detektiert und kann mittels eines Computers dargestellt werden. Mit der Methode wird eine Empfindlichkeit von einem Zerfall  $^{32}\text{P}$  je  $\text{mm}^2$  in einer Minute erreicht (Johnston-RF et al. 1990).

Eine weitere Nachweismethode, die verbreitet Anwendung findet, ist die Nutzung von Antikörpern gegen Phosphoaminosäuren. Hier sind Anti-Phosphotyrosinantikörper hervorzuheben, die im Gegensatz zu Anti-Phosphoserin/-threonin-Antikörpern eine hohe Spezifität aufweisen (von Tiedemann-B 1996). Die Diskriminierung der Aminosäuren kann je nach Aufgabenstellung ein Vorteil sein, wenn nur Tyrosinkinasesubstrate interessieren, ein Nachteil, wenn alle Phosphorylierungen erfaßt werden sollen. Der Nachweis mit Antikörpern kann bei entsprechender Detektionsmethode (z.B. mit radioaktivem Iod oder Lumineszenzerzeugung) in der Empfindlichkeit der beim Einsatz der radioaktiven Phosphornuklide entsprechen (mit Antikörper-Methoden können Antigenmengen von unter 1 ng auf einer Nitrocellulosemembran nachgewiesen werden - Lottspeich-F und Zorbas-H 1998). Der Aufwand ist für die meisten Anwendungen deutlich höher, da die Proteine oder Peptide für die Antikörper zugänglich sein und deshalb z.B. geblottet werden müssen (siehe 2.1.1.3).

Durch die Änderung der Ladung eines Proteins, insbesondere im Fall von multiplen Phosphorylierungen, wird sich i.d.R. auch seine Laufeigenschaft bei einer Elektrophorese (siehe 2.1.1) oder Chromatographie ändern. Daraus resultiert eine mehr oder weniger veränderte Gelposition (Packer-NH et al. 1997, Immler-D et al. 1998) oder Austrittszeit, die sich unter Verwendung von allgemeinen Proteindetektionsmethoden zur Beurteilung des Phosphorylierungszustands heranziehen läßt. Die Methode ist prinzipiell einfach und erfordert keinen zusätzlichen apparativen Aufwand. Voraussetzung sind aber einerseits ausreichend Daten über die jeweiligen Gelpositionen oder Austrittszeiten und andererseits eine ausreichende Veränderung, die von der Zahl der Phosphorylierungen, den betroffenen Proteinen und der Auflösung der Gele bzw.

Chromatographiesäulen abhängt. Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist von der gewählten Detektionsmethode abhängig. Normalerweise ist der Einsatz von Proteingeesamtfärbungen sinnvoll, um die Vorteile der Methode nicht wieder zu verlieren. Die Nachweisgrenze einer Silberfärbung liegt bei etwa 0,5ng (Lottspeich-F 1999). Die UV-Messung durch Absorption bei 205nm erlaubt es, bis etwa 1µg Protein in einem Milliliter Lösung nachzuweisen (Lottspeich-F und Zorbas-H 1998).

Auch die Masseveränderung, die mit einer De- oder Phosphorylierung einhergeht, kann genutzt werden, um diese nachzuweisen. Massenspektrometrische Methoden erlauben einen entsprechend empfindlichen Nachweis (Immler-D et al. 1998). Der sehr hohe technische Aufwand und die damit verbundenen Kosten sind wesentliche Nachteile. Für Standard-Proteomuntersuchungen ist diese Methode zudem verhältnismäßig zeitaufwendig verglichen mit der Erfassung von Radioaktiv-, Antikörper- oder Gesamtproteinmarkierungen, da jede Probe einzeln vermessen werden muß. Die Empfindlichkeit ist mit 1-10fmol für Proteine (MALDI-MS - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) (Kellner-R et al. 1999) sehr hoch.

Pierce bietet seit 1997 INDIA<sup>TM</sup> PhosphoProbe-HRP zum Kauf an. Diese Verbindung besteht aus einem Eisen (III)-Chelat und einer Meerrettich-Peroxidase (engl. Horseradish Peroxidase = HRP). Wie weiter unten erläutert, bindet das chelatisierte Eisen (III) bevorzugt Phosphogruppen von Proteinen oder Peptiden. Das daran gekoppelte Enzym macht durch die Umsetzung eines Farbstoffes die gebundenen Stellen sichtbar. Die Spezifität der Bindung ist unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit, da sie nicht unkritisch ist. Der Aufwand der Methode liegt etwas über dem des Einsatzes von Antikörpern (da zusätzlich ein Abreagieren der Carboxylgruppen vorgeschrieben wird - siehe 2.1.2.2 EDC-Reaktion). Über die Empfindlichkeit des Nachweises werden von Pierce keine Angaben gemacht. In der vorliegenden Arbeit wird mit dem von Pierce in der Vorschrift vorgeschlagenen Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. Die Firma BioRad gibt für diese Detektionsmethode in ihrem Katalog (1998/99) eine Empfindlichkeit von 500pg Protein an. Der empfindlichste Peroxidasenachweis in ihrem Angebot färbt noch 5pg. Kritisch bei der Färbung ist der pH-Wert, der nicht über dem Bindungs-pH-Wert von 6,0 liegen sollte.

Als Chromatographiematerial können Fe(III)- und andere Chelate (siehe unten) außerdem zum relativ spezifischen Abtrennen von Phosphoproteinen und -peptiden dienen.

### ***Chelate***

Einige Metallionen können mit organischen Verbindungen, welche zwei oder mehr Atomgruppierungen enthalten, die als Elektronendonatoren wirken können, sogenannte Chelate bilden.

Chelate spielen bei zahlreichen Energiestoffwechselvorgängen in Lebewesen eine wichtige Rolle. So hat Hämoglobin z.B. ein Eisenatom chelatisiert, das für die Bindung des Sauerstoffs bei der Atmung verantwortlich ist. Chlorophyll hat Magnesium gebunden, um Lichtquanten zu absorbieren und diese Energie der Synthese von Kohlenhydraten zuzuführen. Verschiedene Proteine können darüber hinaus als Speicher und Transporteure für Metalle dienen, indem sie diese chelatisieren (z.B. Phosvitin als Eisenspeicher).

In der Biochemie und Biotechnologie werden Chelate im wesentlichen in der Chromatographie verwendet. Bindet man sie an Säulenmatrices, wie z.B. Sepharosederivate, so erhält man ein in Abhängigkeit des Chelators, der Matrix, des Metalls und der Pufferzusammensetzung spezifisches Bindungsverhalten von Proteinen oder Peptiden (Winzerling-JJ et al. 1992).

Ein gängiges Anwendungsbeispiel ist an Iminodiessigsäure (IDA von engl.: Iminodiacetate) oder NTA (Nitrilotriacetate) chelatisiertes  $\text{Ni}^{2+}$ , das bevorzugt histidinreiche Polypeptide und Proteine bindet. Werden in ein rekombinantes Protein zusätzlich Histidine an ein Kettenende angehängt (sogenannte His-Tags), so läßt es sich mit  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA-Chelat-Sepharose (z.B. His Trap Kit von Pharmacia) in einem Chromatographieschritt mit sehr hoher Effektivität nativ aufreinigen (Lindner-P et al. 1992).

Eisen(III)-Chelate weisen eine gewisse Spezifität für Proteine und Peptide mit Phosphorylierungen auf (Andersson-L et al. 1986 und Muszynska et al. 1986). Pharmacia bietet Fe(III)-IDA-Sepharose als Chromatographiematerial an (Chelating Sepharose Fast Flow). In der Literatur werden Anwendungen für die Aufreinigung von Phosphoproteinen und -peptiden beschrieben (Kucerova-Z 1989, Chaga-G et al. 1989, Songyang-Z et al. 1994). Neben Eisen(III) binden auch andere dreiwertige Metallionen als Chelate phosphorylierte Verbindungen. Posewitz-MC und Tempst-P untersuchten 1999 solche Ionen und stellten fest, daß Gallium(III) als Ion für die immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC), für die Aufkonzentrierung von Phosphopeptiden für die Massenspektrometrie, Eisen(III) überlegen war. Weitere Metallionen mit ähnlichen Bindungseigenschaften sind u.a. Al(III), Zr(III), Sc(III), Lu(III) und Th(III) (Posewitz-MC und Tempst-P 1999, Andersson-L et al. 1986 und Muszynska et al. 1986).

Mit dem bereits erwähnten INDIA<sup>TM</sup> PhosphoProbe-HRP (s.o.) ist eine Markierung von phosphorylierten Proteinen und Peptiden möglich, die an eine Matrix gebunden vorliegen (z.B. Mikrotiterplatte, Blotmembran). Für die Färbung werden die Proben mit EDC (1-ethyl-3-(3-

dimethylaminopropyl)carbodiimid) und Ethylendiamin vorbehandelt (siehe 2.1.2.2), mit BSA (Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin) geblockt, anschließend mit dem Marker beschickt und schließlich mit einem von der Peroxidase umgesetzten Farbstoff nach Wahl nachgewiesen.

Tegge-W und Mitarbeiter (Patentantrag 1998) entwickelten an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig das Eisen(III)-IDA-Fluorescein (Eisen(III)-(N-ethyliminodiessigsäure-N'-fluorescein-thioharnstoff)) (siehe Abb. 1.1), das bei der Markierung von Phosphoverbindungen Anwendung finden sollte. Gast-R gelang es 1999 mit Hilfe dieser Verbindung an Sepharosebeads synthetisierte Phosphopeptide von nicht phosphorylierten Peptiden zu trennen. Dazu verwendete er einen sogenannten Cellsorter, bei dem einzelne Partikel ein Detektionsfenster durchwandern und dabei auf Fluoreszenz vermessen werden. Durch Anlegen einer Spannung können fluoreszente Probestoffe von anderen abgetrennt werden.

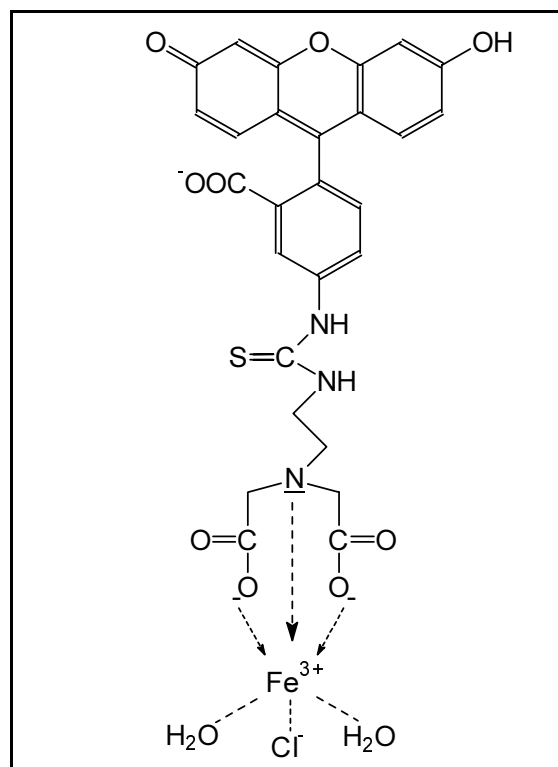


Abb. 1.1: Fe(III)-IDA-Fluorescein

### **1.2.4 Interleukin-1**

(Gute Einführungen in das Thema sind folgende Reviews: Dinarello-CA 1991, 1994, 1997; Bankers-Fulbright-JL et al. 1996; COPE 1999; O'Neill-LAJ 1995; Martin-UM und Falk-W 1997)

#### ***Die Bedeutung von Interleukin-1 für den Organismus***

Die Erforschung der IL-1 (Interleukin-1) Signalwege wird vor allem durch seine Bedeutung für den Organismus motiviert. Es wurde 1940 als eines der ersten Cytokine entdeckt. Weil es Fieber auslösen kann, wurde es zunächst "endogenous pyrogen" genannt. Im Laufe der nächsten Jahre tauchte es in vielen Zusammenhängen und mit diversen Namen auf, bis es aufgrund seiner Eigenschaft, Lymphozyten aktivieren zu können, Interleukin genannt wurde. Obwohl inzwischen viele weitere Wirkungen bei den verschiedensten Zelllinien aufgedeckt wurden, hat man diesen Namen beibehalten (Dinarello-CA 1991). Hauptquellen für IL-1 sind aktivierte Makrophagen, Monozyten und periphere Neutrophile. Darüber hinaus synthetisieren zahlreiche weitere der unterschiedlichsten Zelltypen dieses Cytokin. In der Regel wird IL-1 auf eine Stimulanz, wie z.B. eine Infektion, bakterielle Toxine oder Produkte von aktivierten Lymphozyten hin produziert. Nur wenige Zelllinien wie Haut-Keratinocyten, einige Epithelzelllinien und bestimmte Zelllinien des zentralen Nervensystems (ZNS) bilden IL-1 nicht stimuliert (Dinarello-CA 1991).

Die Vielseitigkeit der IL-1-Signalwege (s.u.) drückt sich in den vielen lokalen und systemischen Wirkungen aus. Es sollen hier nur einige Beispiele genannt werden.

Eine wesentliche Wirkung von IL-1 ist die Stimulation von T-Helfer-Zellen zur Sekretion von IL-2 und der Expression von IL-2-Rezeptoren. Es regt außerdem die Produktion von Immunglobulinen an, fördert die Proliferation zahlreicher Zelllinien (B-Zellen, Fibroblasten, T-Zellen etc.), kann das Wachstum anderer Zelllinien dagegen inhibieren (z.B. Endothelzellen, verschiedene Tumorzelltypen). Es begünstigt thrombotische Ereignisse (u.a. Arteriosklerose) und ist zusammen mit anderen Zytokinen wesentlich an akuten und chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt (Stimulierung des Arachidonsäure-Metabolismus, Sekretion inflammatorischer Proteine wie bestimmter Proteasen), kann Fieber erzeugen, sogenannten slow-wave-Schlaf induzieren und Kopfschmerzen auslösen. Es ist an Prozessen der Hämatopoiese beteiligt und aktiviert Osteoblasten, wodurch die Knochenneubildung unterdrückt wird. Außerdem kann IL-1 bei einigen Zelllinien den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren, bei anderen wiederum als Schutz vor dem Zelltod dienen. Kaum eine Zelllinie reagiert nicht auf IL-1 (COPE 1999, Dinarello-CA 1991 und 1994).

Die Ähnlichkeit der Komponenten des Signalweges vom IL-1RI bis zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch die Phosphorylierung des Inhibitors I $\kappa$ B mit den Elementen der Dorsal-Ventral-Regulierung bei *Drosophila melanogaster* (Taufliege) sowie Ähnlichkeiten bei Signalwegen von Nematoden (Fadenwürmer) und Mikroorganismen mit dem Wachstumsfaktor FGF (engl. Fibroblast Growth Factor) und IL-18 (kein Signalpeptid, ähnliche Tertiärstruktur und Sequenzhomologie) und nicht zuletzt Parallelen zu den Folgen von zellulärem Streß lassen vermuten, daß es sich um einen sehr alten Faktor in der Entwicklung der Organismenwelt handelt, und unterstützen damit seine zentrale Bedeutung (Dinarello-CA 1994 und 1997).

### ***Die Interleukin-1-Familie***

Die Interleukin-1-Familie umfaßt drei Proteine, die von getrennten Genen auf dem gleichen Chromosom kodiert werden. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind funktionell, binden an die gleichen Rezeptoren (siehe unten) und haben bis auf wenige Ausnahmen das gleiche Wirkungsspektrum. Sie werden darüber hinaus beide als 31kDa große Polypeptide synthetisiert und anschließend in ihre reifen 17kDa Formen prozessiert. IL-1 $\alpha$  besteht aus 159 Aminosäuren und hat einen pI-Wert um 5. Die 153 Aminosäuren von IL-1 $\beta$  sind nur zu etwa 25% homolog zu denen von IL-1 $\alpha$  (auf genetischer Ebene zeigen sie allerdings 45% Homologie). Der pI von IL-1 $\beta$  liegt bei 7.

Das dritte Mitglied der IL-1-Familie, der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra), konkurriert zwar mit den beiden anderen um die Bindungsstellen an den IL-1-Rezeptoren, zeigt aber keine aktive Signalfunktion. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß IL-1ra im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nicht zwei, sondern nur eine Bindungsstelle besitzt, mit der nur eine der beiden Bindungsstellen an den Rezeptoren (IL-1R, s.u.) gebunden werden kann. So kann, der gängigen Theorie zufolge, die Konformation der IL-1R nicht geändert und in der Folge kein Signal in das Cytosol geleitet werden. Dennoch zeigen alle IL-1 deutliche Übereinstimmung in ihrer räumlichen Struktur, die einem aus 8  $\beta$ -Faltblättern gebildeten Faß gleicht. IL-1ra ist im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , deren Aminosäuresequenzen etwa 20% bzw. 25% Homologie zu ihrem Antagonisten aufweisen, glykosyliert, so daß eine Masse von 25kDa resultiert. Durch alternatives Splicing werden zwei verschiedene intrazelluläre Formen des Antagonisten gebildet (icIL-1ra Typ I und Typ II) (Muzio-M et al. 1999).

IL-1 $\alpha$  ist auch als nicht prozessierte Vorform (pIL-1 $\alpha$ ) aktiv, pIL-1 $\beta$  so gut wie nicht. Eine biologisch aktive 22kDa-Form (möglicherweise ist das größere Molekulargewicht auf Myristoylierungen zurückzuführen), hauptsächlich von pIL-1 $\alpha$ , wurde verankert auf Zelloberflächen gefunden (Membran-IL-1). Darüber hinaus sind Formen kleineren Molekulargewichts in Serum und Urin nachgewiesen

worden.

pIL-1 $\alpha$  verbleibt in der Regel gleichmäßig verteilt im Cytosol. Bei Zelltod oder z.B. durch die Stimulierung von Calpainen, kalziumabhängigen, membranassoziierten Cysteinproteasen, kann es zu löslichem IL-1 prozessiert werden, das dann die Zellen verläßt. Es ist generell nur in Körperflüssigkeiten von schwer Erkrankten zu finden. An den IL-1 Rezeptor Typ I gebunden findet man IL-1 $\alpha$  internalisiert in Verbindung mit dem Zellkern. Zusammen mit dem Rezeptor kann es DNA binden. Es könnte, vielleicht auf einzelne Zelllinien beschränkt, auch als intrazellulärer Botenstoff dienen. Für menschliche Fibrosarkomzellen stellten Muzio-M et al. 1999 allerdings fest, daß die IL-1 $\alpha$ -induzierte Produktion von IL-8-mRNA von IL-1ra, nicht aber von den intrazellulären Formen blockiert werden konnte. Eine IL-1 $\alpha$ -Aktivität innerhalb der Zellen trat also nicht auf.

Die mRNA von IL-1 $\beta$  wird stark reguliert. Bei einer Infektion können vermutlich verschiedene mikrobielle Produkte die mRNA stabilisieren. So ließe sich erklären, warum bereits geringe Konzentrationen an Lipopolysacchariden oder wenige Bakterien pro Zelle die Translation von großen Mengen IL-1 $\beta$  auslösen. IL-1 bewirkt darüber hinaus selbst die Deadenylierung seiner mRNA. pIL-1 $\beta$  wird von mononuklearen Phagozyten in geringen Mengen sekretiert (Dinarello-CA 1994 und 1997). In der Regel bedarf es aber der Prozessierung durch Proteasen, bevor es aus der Zelle ausgeschleust wird. Dies geschieht möglicherweise mit Hilfe von Lysosomen und Mikrotubuli, in denen bzw. an die es teilweise assoziiert gefunden wird. Der Reifeprozess kann vermutlich durch verschiedene, nur z.T. spezifische Proteasen katalysiert werden, die das Aminoende abspalten. ICE (IL-1 Converting Enzyme), auch Caspase-1 genannt, spielt hier aber wohl die wichtigste Rolle. Die hohe Affinität von pIL-1 $\beta$  zum löslichen IL-1 Rezeptor Typ II könnte im Falle der Sekretion einen Schutz vor Proteasen darstellen.

Nur die unreifen IL-1ra besitzen eine klassische sekretorische Signalsequenz. Die intrazellulären Formen von IL-1ra dienen möglicherweise als Reservoir. Bei Zelllyse könnten sie ausgeschüttet werden und damit Entzündungsreaktionen abpuffern (Muzio-M et al. 1999). IL-1ra wird z.B. von mononuklearen Phagozyten, polymorphonuklearen Zellen und Fibroblasten gebildet, wenn diese mit IgG (Immunglobulin G), Cytokinen und bakteriellen Produkten stimuliert werden (Muzio-M et al. 1999).

Kürzlich entdeckten Kumar-S und Mitarbeiter (2000), daß es vier weitere homologe Proteine gibt, die zur Interleukin-1-Familie gerechnet werden müssen: IL-1H1, IL-1H2, IL-1H3 und IL-1H4. Hier sind noch wenige Daten über die Funktion bekannt.

### ***Interleukin-1-Rezeptoren***

Zwei Rezeptoren, IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1RI) und Typ 2 (IL-1RII), binden die IL-1-Familie. Sie unterscheiden sich im wesentlichen im cytosolischen Bereich. Der extrazelluläre Teil umfaßt 3 immunoglobuläre Schleifen, der die Membran durchspannende Anteil ist mit etwa 20 Aminosäuren relativ kurz. IL-1RI besitzt eine wesentlich längere intrazelluläre Kette (215 Aminosäuren), die in der Lage ist, nachfolgende Signalkaskaden auszulösen. Seine extrazellulären Glykosylierungen sind entscheidend für eine feste Bindung an IL-1 und führen zu einem Molekulargewicht von etwa 80kDa. Es wurde berichtet, daß er in Folge einer IL-1-Stimulierung phosphoryliert wird (Dinarello-CA 1997, O'Neill-LAJ 1995). Bei dem in der Membran verankerten IL-1RII ragt eine nicht funktionelle, sehr kurze Aminosäurekette (29 Aminosäuren) in das Cytosol. Mitsamt den Glykosylierungen weist er ein Molekulargewicht von etwa 68kDa auf. Bei gesunden Erwachsenen liegt der extrazelluläre Teil des IL-1RII auch als löslicher Rezeptor (sR) vor.

IL-1RII bindet bevorzugt und nahezu irreversibel IL-1 $\beta$  und ist damit wohl der natürliche Antagonist von IL-1 $\beta$ . IL-1 $\alpha$  bindet fast irreversibel an IL-1RI, stärker als IL-1 $\alpha$ , das wiederum stärker als IL-1 $\beta$  bindet.

### ***IL-1-Rezeptor assoziierte Proteine***

1990 entdeckten Lewis-C und Mitarbeiter, daß der Interleukin-Rezeptor als multimolekularer Komplex vorliegt. Mittlerweile sind eine Reihe von Proteinen bekannt, die an den IL-1RI (siehe Abb. 1.2) und zum Teil auch an den IL-1RII binden.

Als Folge der Stimulierung durch IL-1 wird zunächst das die Membran durchspannende und den Rezeptoren verwandte IL-1Rezeptor Accessory Protein (IL-1RAcP) so gebunden, daß der Ligand fester gehalten wird, ohne diesen selbst zu binden (Wesche-H et al. 1998). Es hat ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 66kDa und weist etwa 25% Homologie zu IL-1R Typ 1 und 2 auf (Greenfeder-SA et al. 1995). Es bindet auch den Typ 2-Rezeptor, wenn IL-1 daran gebunden ist (Malinkowsky-D et al. 1998). Eine nicht auf proteolytischer Spaltung des IL-1RAcP beruhende lösliche Form ist beschrieben worden (Greenfeder-SA et al. 1995). Ohne die Bindung von IL-1RAcP an den IL-1RI wird kein oder kein vollständiges Signal weitergeleitet (Korherr-C et al. 1997).

1996 wurde nach mehreren Nachweisen von Kinaseaktivität im Rezeptorkomplex (Martin-M et al. 1994, Croston-GE et al. 1995) IRAK als erste Kinase von Cao-Z und Mitarbeitern identifiziert. Volpe-F und Mitarbeiter vermuteten 1997, daß die Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) über IL-1RAcP an den Rezeptorkomplex rekrutiert wird. Die Versuche von Wesche-H und seinen



Mitarbeitern im gleichen Jahr widersprachen denen von Volpe zum Teil und ließen annehmen, daß zwischen die beiden Proteine noch der Faktor MyD88 geschaltet wird, der IRAK an den Rezeptorkomplex bindet.

Eine zweite assoziierte Kinase, die Verwandtschaft mit IRAK aufweist und deshalb IRAK-2 genannt wird, wurde ebenfalls 1997 entdeckt. Muzio-M und ihre Mitarbeiter zeigten dabei, daß MyD88 mit IRAK-2 und dem IL-1RAcP wechselwirkt und schlugen deshalb ebenfalls eine Adapterfunktion für MyD88 vor, was 1998 von Burns-K und Mitarbeitern und Medzhitov-R und Mitarbeitern bekräftigt wurde. Letztere wiesen auch auf eine Beteiligung von MyD88 in humanen Toll-Signalwegen (Toll wurde zunächst in *Drosophila* entdeckt und ist homolog zu IL-1RI) hin, die an der Immunabwehr beteiligt sind. Weitere Untersuchungen von Burns-K und Mitarbeitern (2000) zeigten, daß noch ein weiteres Protein an der Rekrutierung der IRAK an den Rezeptorkomplex beteiligt ist, Tollip.

1999 entdeckten Wesche-H und Mitarbeiter eine dritte IRAK, die sie IRAK-M nannten (M für Monozyten, in denen sie die Kinase fanden und von denen sie hauptsächlich gebildet wird). Sie stellten außerdem fest, daß alle Mitglieder der IRAK-Familie in vitro Homo- und Heterokomplexe bilden können.

Die Kinaseaktivität der IRAK hat nach Knop-J und Martin-MU (1999) beim Interleukin-1-Signalweg keine direkte Funktion. Sie bestätigten Yamin-T-T und Miller-DK (1997) in der Beobachtung, daß IRAK normalerweise innerhalb weniger Minuten proteolytisch abgebaut wird. Dafür sei aber die Phosphorylierung der IRAK notwendig, die eine Autophosphorylierung ist. Mittlerweile hat man IRAK auch in Verbindung mit anderen Signalwegen gebracht (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Vig-E et al. 1999), humanes Toll (hToll) (Medzhitov-R et al. 1998)).

IIP1 (IL-1R interagierendes Protein 1) wird von Mitcham-JL und Sims-JE (1995) und Sims-JE und Mitarbeitern (1996) als ein ebenfalls an den IL-1R bindendes Protein beschrieben (siehe unten). 1997 entdeckten Reddy-SA und Mitarbeiter, daß die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) mit dem IL-1-Rezeptor wechselwirkt. 1998 zeigten Marmiroli-S et al., daß sie offenbar an den phosphorylierten IL-1-Rezeptorkomplex bindet. Ihre Aktivierung durch IL-1 war vorher bereits beobachtet worden (O'Neill-LAJ 1995).

Sacht-G et al. fanden 1999 ein weiteres Protein am Rezeptorkomplex assoziiert, mot-3 (p74mortalin, ein Protein aus der Heat Shock Protein HSP70-Familie). Die Bedeutung dieses Fundes konnte noch nicht geklärt werden.

**Weitere Interleukin-1-Signalwege**

Mehr oder weniger alle bekannten Signalleitungsmechanismen wurden bereits mit IL-1 in Verbindung gebracht. Durch das individuelle Zusammenspiel von verschiedenen Signalwegen können in unterschiedlichen Zelltypen andere Reaktionsmuster erhalten werden (Martin-MU und Falk-W 1997). Hier sollen einige weitgehend aufgeklärte IL-1-Signalwege dargestellt werden (siehe auch Abb.1.2). Nachdem die phosphorylierte IRAK den Rezeptorkomplex verlassen hat, bindet sie TRAF6 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6) (Cao-Z et al. 1996b). Anschließend binden TAK1 (Ninomiya-Tsuji-J et al. 1999), das eine MAPKK-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase-Kinase-Kinase) ist, TAB1 (TAK1 Bindendes Protein (Shibuya-H et al. 1996)) und TAB2 (Takaesu-G et al. 2000) an TRAF6. TAK1 kann zwei Signalwege einschlagen. Bei einem geht die Kinase eine Bindung mit einem Komplex aus NIK (NF $\kappa$ B Induzierende Kinase), IKK (I $\kappa$ B Kinase) und IKAP (IKK-Komplex Assoziiertes Protein) ein und phosphoryliert NIK, das sich in Folge autophosphoryliert und dann IKK aktiviert. Diese phosphoryliert schließlich I $\kappa$ B (Inhibitorischer Faktor  $\kappa$ B). Dieser Faktor verläßt dadurch den Komplex mit NF $\kappa$ B und wird proteolytisch gespalten. NF $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der, wenn er von I $\kappa$ B freigesetzt wird, an spezifische DNA-Sequenzen,  $\kappa$ B genannt, bindet und dadurch die Transkription der anliegenden Gene fördert.

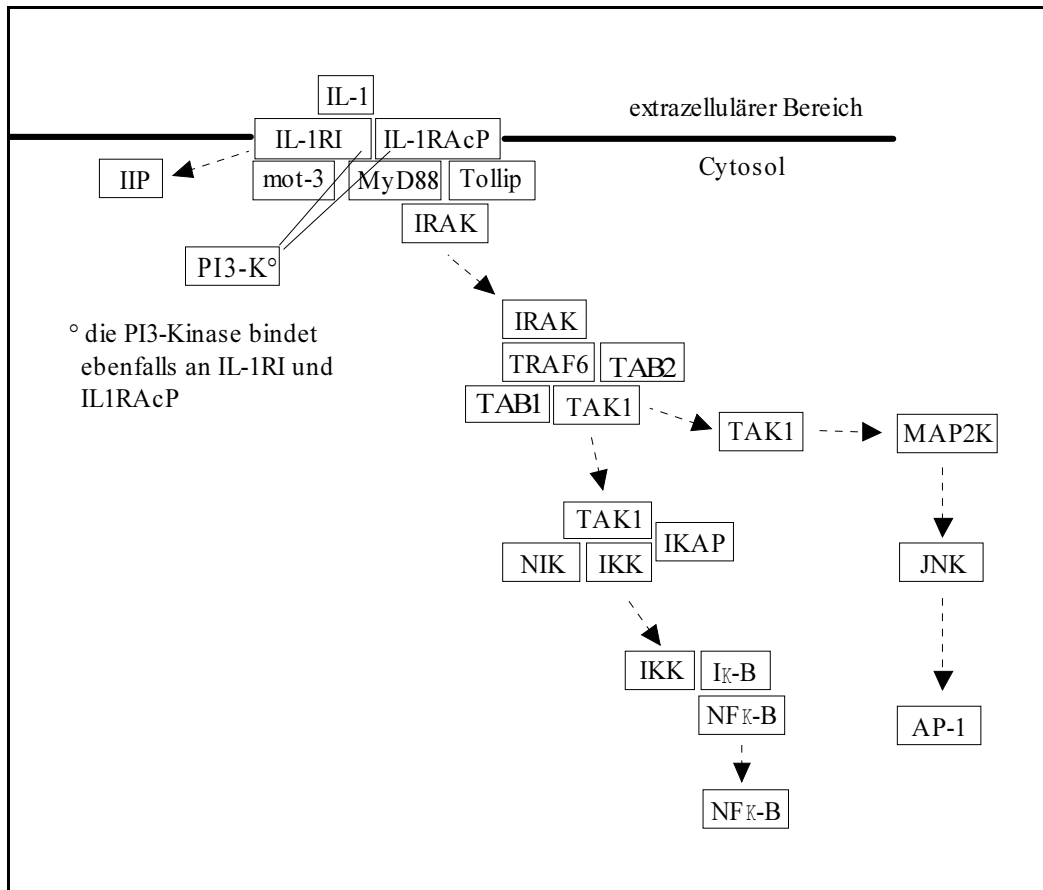


Abb. 1.2: Modell des IL-1RI-Komplexes und einzelner Signalwege nach Stimulierung mit IL-1

Bei einem anderen Signalweg aktiviert TAK1 die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) vermutlich über MAPK-Kaskaden, was schließlich zur Aktivierung eines anderen Transkriptionsfaktors führt: AP-1 (Aktivator Protein-1).

IIP1 ist ein den G-Protein aktivierenden Proteinen ähnlicher Faktor, der den IL-1R bindet. Er dissoziiert nach IL-1-Aktivierung. Ein Vergleich mit der Struktur von GTPasen zeigte, daß der IL-1RI und IL-1RAcP vermutlich GTPase-Funktion besitzen, da sie entscheidende strukturelle Ähnlichkeiten mit Proteinen der Ras- und der Rho-Familie aufweisen. Zusammen mit weiteren Indizien kann man zu dem Schluß kommen, daß durch IL-1-Stimulation ein vom Rezeptor gebundenes GDP (Guanosindiphosphat) durch GTP (Guanosintriphosphat) ausgetauscht werden kann, was in der Folge zusätzlich zur Bindung eines G-Proteins, Hydrolyse eines GTP, Aktivierung einer Phospholipase, zur Hydrolyse von Phospholipid und damit zur Generation von Diacylglycerin oder Phosphatidsäure führen könnte (Dinarello-CA 1997).

Von anderen IL-1-Signalwegen fehlen vor allem Details über die Verknüpfung mit dem IL-1RI. Vermutlich durch die schnelle Aktivierung eines kleinen G-Proteins werden weitere MAP-Kinase-

Kaskaden gestartet, die diverse Transkriptionsfaktoren aktivieren können. Darüber hinaus werden saure und neutrale Sphingomyelinasen aktiviert, die zur Freisetzung von Ceramid führen. Dieser sogenannte second messenger induziert die Aktivierung der MAP-Kinase ERK (durch extrazelluläres Signal regulierte Kinase) und von NFκB sowie die Phosphorylierung des Hitzeschockproteins hsp27 (Martin-MU und Falk-W 1997).

Die Phosphorylierung des EGF-R (epidermal growth factor receptor) nach Stimulierung mit IL-1, welche dazu führt, daß die Affinität für seinen Liganden verringert wird, geschieht durch eine MAP-Kinase der JNK-Familie (Jun N-terminale Kinase). Vermutlich sind zumindest bei einigen Zelllinien die cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) abhängige Protein Kinase A (PKA), die PKC und eine β-Casein-Kinase involviert (Bankers-Fulbright-JL et al. 1996).

### **1.2.5 EL-4-Zellen**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten EL-4-Zellen gehören zu einer Maus-T-Zelllinie (T-Lymphozyten, siehe unten), die einem chemisch induzierten Tumor entstammt. Mit ihnen wurden Testsysteme zum IL-1-Nachweis etabliert, die auf der Ausschüttung von Interleukin-2 (IL-2) als Folge der IL-1-Stimulierung beruhen (Ibelgauf-H 1995). Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sublinie EL-4 6.1 ließen sich durch Crosslinking von IL-1α mit Rezeptoren keine IL-1-Rezeptoren Typ II nachweisen (Bron-C et al. 1987; Martin-M et al. 1994). Für die Untersuchung der Signalwege von IL-1 mittels des Typ I Rezeptors ist das neben der relativ hohen Anzahl von  $1-2 \cdot 10^4$  Rezeptoren je Zelle (Lowenthal-JW et al. 1986; Grenfell-SJ et al. 1992) von Vorteil. Bei fast allen Zelllinien sind IL-1RI zu finden, bei der Mehrheit aber auch IL-1RII (Martin-UM und Falk-W 1997, Dinarello-CA 1994). Die meisten Zelllinien besitzen nur etwa 100-200 IL-1 Rezeptoren (Bankers-Fulbright-JL et al. 1996, Dinarello-CA 1991).

T-Zellen gehören zu den Lymphozyten (weiße Blutzellen). Sie sind im Gegensatz zu B-Zellen, die für die humorale Antikörperantwort verantwortlich sind, für die zelluläre Immunantwort zuständig. Die T-Zellen lassen sich in Helfer-T-Zellen, dazu gehören EL-4-Zellen (Martin-M et al. 1994), und cytotoxische T-Zellen unterteilen. Erstere arbeiten indirekt für die Immunabwehr, indem sie z.B. helfen, Makrophagen und B-Zellen (z.B. durch die Ausschüttung von Mediatoren) zu aktivieren. Cytotoxische T-Zellen töten (z.B. von einem Virus oder einem Mikroorganismus) infizierte Zielzellen direkt. Beide Formen erkennen ihre Ziele durch sogenannte MHC-Komplexe, die von betroffenen Zellen präsentiert werden und zellfremde Peptidfragmente beinhalten.

### 1.3 Ziel und Aufgaben der Untersuchungen mit FIF

Auf dem Hintergrund der Bedeutung von Proteinphosphorylierungen wird deutlich, daß Nachweismethoden für Phosphoproteine oder -peptide wichtig sind. Eine neue Methode mit FIF könnte aufgrund der Nachteile der bereits etablierten Verfahren, wie der potentiell schädigenden Wirkung von Radioaktivität durch  $^{32}\text{P}$  oder  $^{33}\text{P}$ , dem eingeschränkten Nachweisspektrum von Phosphoamino­säuren beim Nachweis mit Antikörpern oder generell durch weniger aufwendige Arbeitsbedingungen (kein Strahlenschutz, potentiell wenig Arbeitsschritte) eine Bereicherung sein. Nicht zuletzt ist FIF ein sehr preiswertes Reagenz.

Für seinen Einsatz muß festgestellt werden, unter welchen Bedingungen FIF Phosphoproteine oder -peptide bindet, wie spezifisch die Färbung ist und mit welchen Methoden es kombinierbar ist.

## 2. Methoden

### 2.1 Theoretische Hintergründe zu verwendeten Methoden

#### 2.1.1 Elektrophorese

Die Wanderung geladener Teilchen in Lösung in einem elektrischen Feld wurde vor rund 100 Jahren zuerst von Kohlrausch untersucht und beschrieben und sehr bald als Elektrophorese bezeichnet. Da die in einem elektrischen Feld entstehende Joulesche Wärme zu Konvektion und damit zur Dispersion von Zonenprofilen der zu trennenden Teilchen führt, mußten zunächst Wege gefunden werden, dieses Phänomen zu minimieren.

Tiselius erhielt 1948 den Nobelpreis für die erste Elektrophoresemethode. 1955 führte Smithies mit einem Stärkegel die Gelelektrophorese (siehe 2.1.1.1) ein. Hjerten gelang es 1967 als erstem, eine elektrophoretische Trennung in einer offenen Glasröhre durchzuführen. Daraus begann sich knapp 10 Jahre später die Kapillarelektrophorese (siehe 2.1.1.2) zu entwickeln, als deren Pioniere Mikkers und Everearts sowie Jorgenson und Lukas gelten. Ihnen gelang es, das Konvektionsproblem durch die Schaffung großer Oberflächen im Verhältnis zum Probenvolumen gering zu halten. Die gute Abführung der Jouleschen Wärme ermöglichte die Verwendung relativ hoher Spannungen und damit kürzere Trennzeiten als bei der Gelelektrophorese.

Bei der trägerfreien (Free-Flow-) Elektrophorese wird an einen kontinuierlichen Pufferstrom im rechten Winkel ein elektrisches Feld angelegt. Die Dispersion durch Konvektion wird durch die Kühlung der relativ großen Oberfläche des Pufferstroms gering gehalten.

(Siehe dazu die Lehrbücher von Landers-JP 1994, Engelhardt-H et al. 1994, Lottspeich-F und Zorbas-H 1998, Westermeier-R 1993).

##### 2.1.1.1 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird mit einer stabilisierenden Matrix die durch Wärme-Konvektion bedingte Dispersion der Teilchen gemindert. Als besonders geeignete Matrices werden heute routinemäßig Polyacrylamid oder Agarose für die Trennung von Proteinen, Peptiden, DNA oder RNA eingesetzt. Durch die Wahl des Vernetzungsgrades läßt sich mit diesen die Trennwirkung gezielt optimieren. Je nach Elektrophoresepuffer, Probenzusätzen oder Derivatisierung der Matrix lassen sich verschiedene Trennprinzipien einführen (z.B. native Gelelektrophorese, SDS-PAGE und IEF (siehe unten)).

**2D-PAGE (zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese)**

O'Farrell-PH publizierte 1975 das heutige Standardprinzip einer zweidimensionalen Auftrennung von komplexen Proteingemischen mit gelelektrophoretischen Methoden. In der ersten Dimension trennte er seine Proteinprobe mittels einer denaturierenden isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach den isoelektrischen Punkten (pI-Wert, siehe unten) der einzelnen Proteine. Das IEF-Gel, ein schmaler Gelstreifen, überführte er schließlich in die zweite Dimension, auf ein SDS-Gel, welches Proteine nach ihrem Molekulargewicht trennt (siehe Abb. 2.1). Dadurch, daß die zweite Dimension im rechten Winkel zur ersten trennt, ergibt sich ein zweidimensionales Trennmuster.

Die IEF basiert darauf, daß in einem Gel pH-Werte lokal geschaffen werden. Dies kann entweder durch die Zugabe von sogenannten Ampholinen erzielt werden oder durch das Immobilisieren von Carboxyl- und Aminogruppen. Aufgetragene Proteine bewegen sich im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung in Richtung ihres Gegenpols. An der Stelle, an der der lokale pH-Wert dem pI-Wert entspricht, d.h. an der die Gesamtladung eines Proteins ausgeglichen ist, kann es nicht mehr wandern. Auf diese Weise werden Proteingemische nach der Gesamtladung der einzelnen Proteine getrennt. Die SDS-Gelelektrophorese ist durch die Beladung der zu trennenden Proteine bei 95°C mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat) gekennzeichnet. Dieses lagert sich in die Proteine ein, löst deren Struktur auf und bewirkt einen negativen Ladungsüberschuß (zusätzlich gibt man Dithiothreitol oder  $\beta$ -Mercaptoethanol zu, um Schwefelbrücken aufzuspalten). Bringt man so beladene Proteine in ein elektrisches Feld, wandern sie in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dann nur noch von der Länge der Proteinketten, der Größe der Proteine, abhängig.

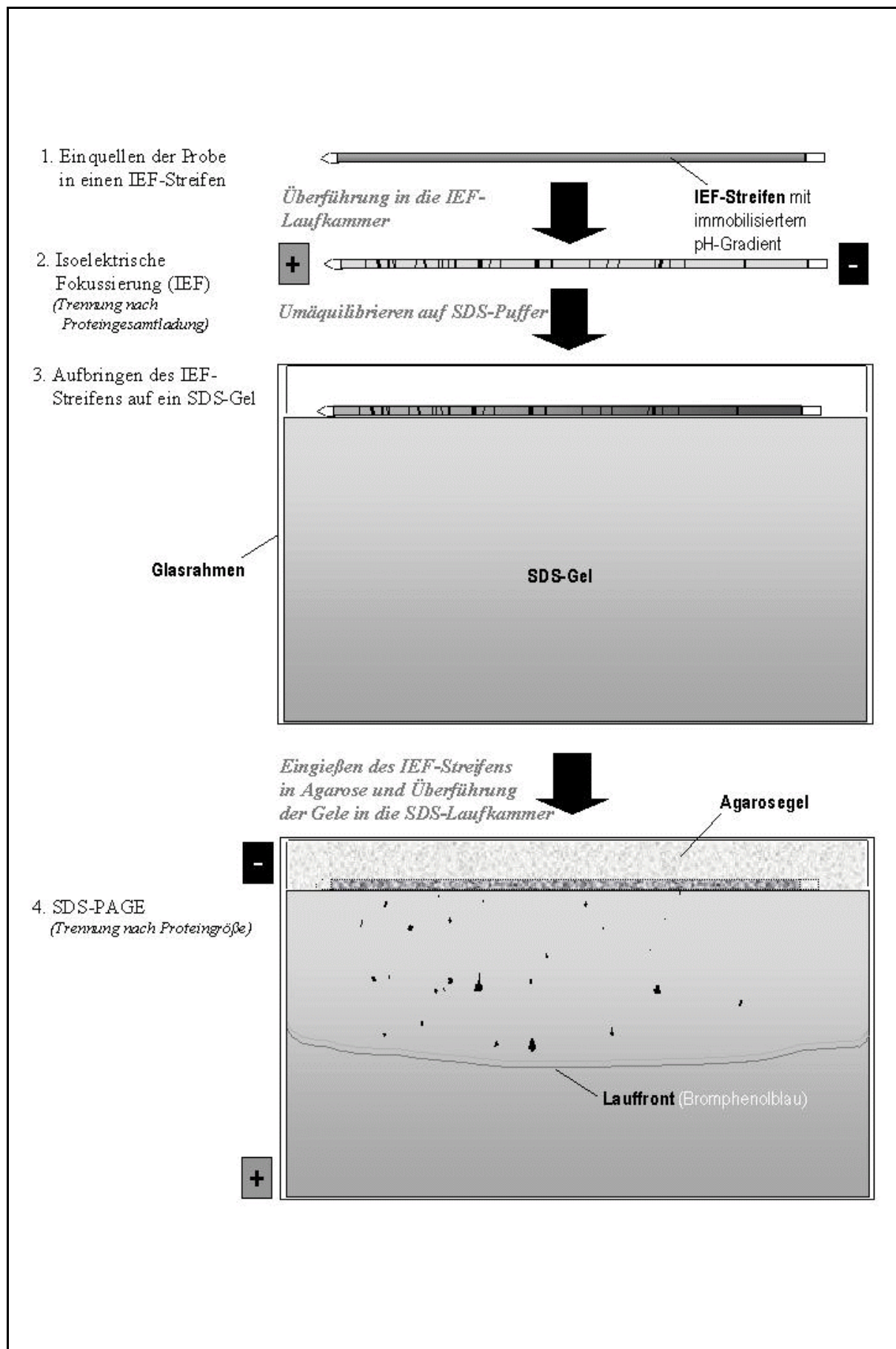


Abb. 2.1: Schema der 2D-PAGE



### 2.1.1.2 Kapillarelektrophorese

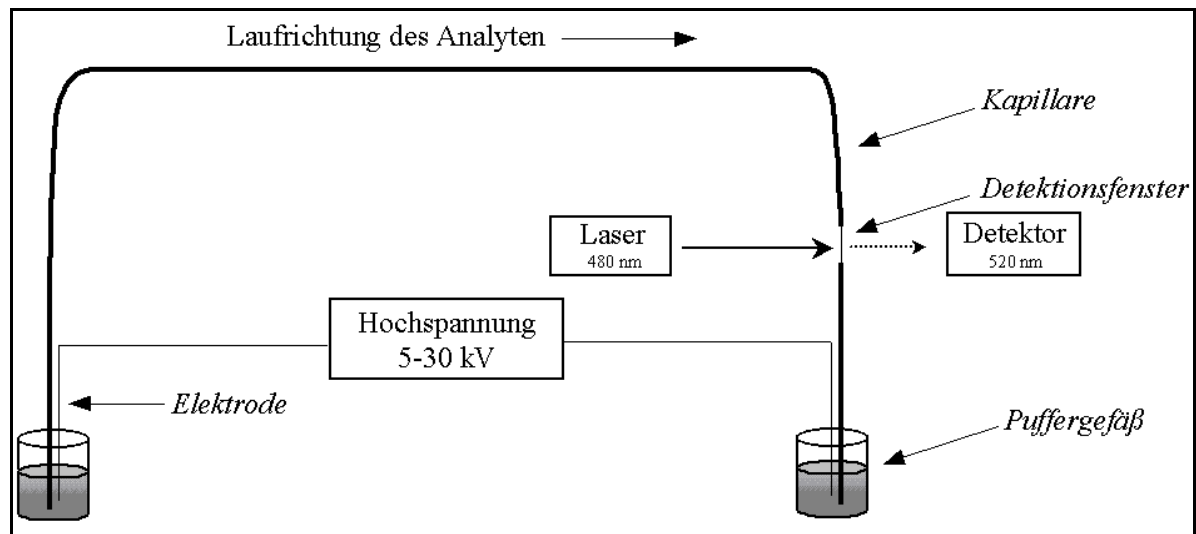


Abb. 2.2: Schema der Kapillarelektrophoreseapparatur mit LIF-Detektor

Die Kapillarelektrophorese (CE von englisch Capillary Electrophoresis) kombiniert die Verwendung von Kapillaren (i.d.R. mit Innendurchmessern von 25 bis 100  $\mu\text{m}$ ) mit der Elektrophorese. Durch die große Oberfläche im Verhältnis zum Lösungsvolumen wird die durch Wärme-Konvektion bedingte Dispersion der Probe vernachlässigbar, insbesondere dann, wenn eine zusätzliche Kühlung eingeführt wird. Es können an mit elektrolytischer Lösung gefüllte Kapillaren hohe Spannungen (5 - 30 kV) und damit hohe Feldstärken angelegt werden (siehe Abb. 2.2). Dadurch erreicht man eine im Verhältnis zur Gelelektrophorese kürzere Trennzeit. Weitere Vorteile gegenüber der Gelelektrophorese sind die bessere Automatisierbarkeit, die auch dadurch bedingte bessere Reproduzierbarkeit, die leichtere Handhabung und die Möglichkeit der direkten Detektion durch die optisch durchlässigen Kapillaren. Nachteilig ist die geringere Zahl der in einem Elektrophoreselauf trennbaren Analyten und der aufgrund der Automatisierung und der direkten Detektion bedingte, in der Regel höhere technische Aufwand, der mit höheren Kosten verbunden ist.

Menge und Vielfalt der variablen Faktoren machen die CE zu einer sehr flexiblen Methode. Bringt man durch Druck oder Anlegen einer Spannung eine Analysenprobe ein, wird diese je nach den gewählten Bedingungen im elektrischen Feld wandern. Entscheidende Größen für das Wanderverhalten sind neben Temperatur, Spannung, Kapillarlänge und -durchmesser, Puffer, Molarität des Puffers und möglichen Zusätzen wie Salzen auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Analyten wie Ladung, Größe, Form etc..

Eine Besonderheit der CE liegt in dem kleinen Felddurchmesser, der dazu führt, daß der sogenannte elektroosmotische Fluß (EOF) für die Trennung eingesetzt werden kann. Der EOF verursacht einen Fluß der Pufferlösung im elektrischen Feld. Er kommt dadurch zustande, daß aufgrund der negativen Ladung der Kapillarwand von dieser ausgehend in die Pufferlösung ein Potential  $\zeta$  entsteht. Die der Ladung der Wand entgegengesetzten Ladungen im Puffer konzentrieren sich im Randbereich der Kapillare. Legt man nun ein elektrisches Feld entlang der Kapillare, also senkrecht zum Potential  $\zeta$  an, so werden die im Randbereich konzentrierten Ladungen von ihrem Gegenpol angezogen. Die Ladungen an der Kapillarwand bilden dabei eine statische, elektrische Doppelschicht (innere Helmholtz-Schicht). Erst die daran angrenzende diffuse Doppelschicht (äußere Helmholtz-Schicht) ist mobil und wandert. Die betroffenen Ionen ziehen ihre Hydrathülle mit sich und bewirken damit, daß sich die gesamte Flüssigkeitssäule bewegt. Durch die geringen Innendurchmesser der Kapillaren ist die Laufront sehr gleichmäßig, fast eben, so daß gerade Wanderungszonen und somit gute Trennbedingungen resultieren.

Bei den i.d.R. verwendeten Quarzkapillaren befinden sich Siliziumoxid-Gruppen auf der Oberfläche, die negative Ladungen tragen. Die Gegenionen aus dem Puffer sind deshalb die positiv geladenen und so erhält man bei Anlegen einer Spannung einen Fluß in Richtung Kathode. Die Stärke des EOF ist unter anderem vom pH-Wert und der Konzentration des Puffers abhängig. Ein hoher pH-Wert erzeugt mehr  $\text{SiO}^-$ -Ionen und damit ein höheres Potential  $\zeta$ . Eine niedrige Pufferkonzentration bewirkt einen höheren EOF.

Zur Unterdrückung des EOF kann eine Beschichtung der Kapillaren dienen. Dazu kann man entweder isolierende Polymere immobilisieren (kovalentes Coating), oder einen ähnlichen Effekt durch Zugabe von solchen Polymeren in die Pufferlösungen erreichen (dynamisches Coating).

Als Detektionsmethoden dienen in der CE standardmäßig bisher UV-Spektrometrie und Laser induzierte Fluoreszenz-Messung (LIF). Darüber hinaus sind auch Massenspektrometer, Radioaktivitätsdetektoren, amperometrische Detektoren und Leitfähigkeitsmessgeräte in Verwendung.

### **2.1.1.3 Blotten**

Der Transfer von in einem Gel aufgetrennten Proben auf eine Membran (Blotting) kann ebenfalls mittels Anlegen eines elektrischen Feldes durchgeführt werden (Elektroblotting). Dabei werden Membran und Gel entweder in einem Pufferreservoir (Tank-Blotting) oder zwischen in Puffer getränkten Saugpapierschichten direkt in Kontakt gebracht (Semidry-Blotting). (Siehe dazu Lottspeich-F und

Zorbas-H 1998).

## 2.1.2 Sonstiges

### 2.1.2.1 Peptidmembranen

In der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte Peptidmembranen verwendet. Es handelt sich dabei um Zellulosemembranen, auf die kurze Peptidsequenzen nach Wahl synthetisiert werden können. Mit der dafür verwendeten Spotsynthese (Frank-R 1992) werden Peptidpunkte (Spots) in Rastern (siehe dazu Abb. 5.4 bis 5.8) erzeugt. Damit können z.B. Bindungsspezifitäten von an Peptide bindenden Molekülen oder Enzymspezifitäten, wie in der vorliegenden Arbeit von Kinasen, untersucht werden. Die Membranen wurden freundlicherweise von Dr. Ronald Frank und seiner Gruppe (Molekulare Erkennung, GBF) bereitgestellt.

### 2.1.2.2 EDC-Reaktion

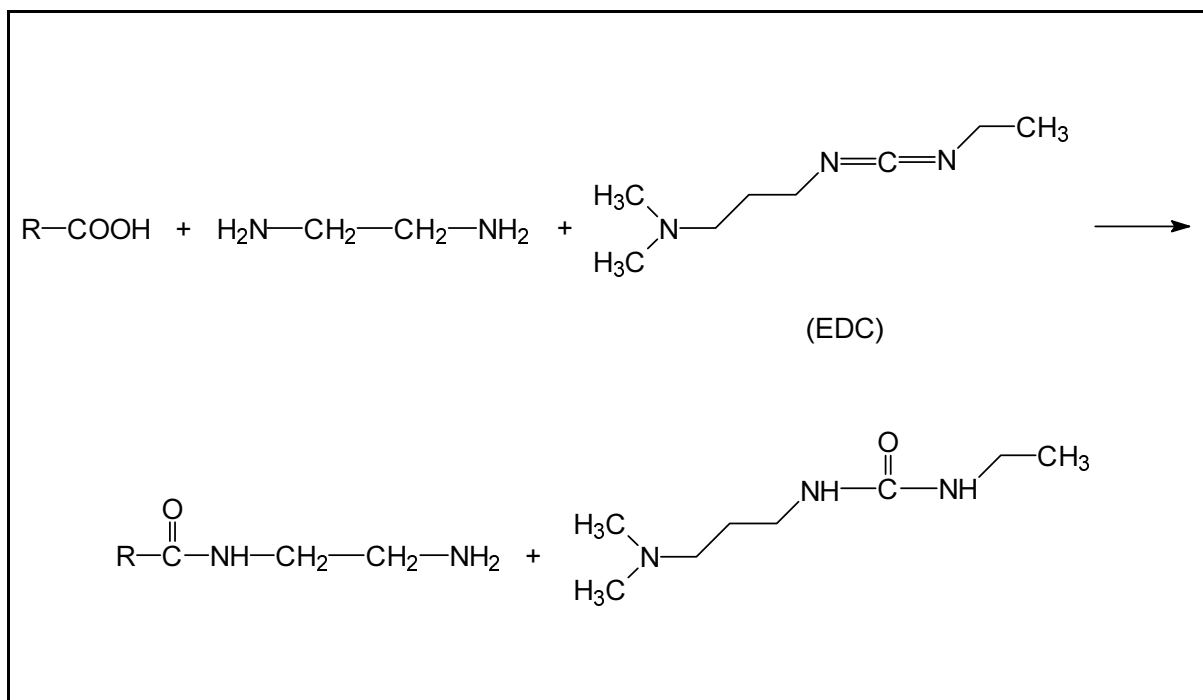


Abb. 2.3: Schema der EDC/Ethylendiamin-Reaktion

Für die Versuche mit INDIA<sup>TM</sup>-PhosphoProbe-HRP von Pierce und z.T. für die Versuche mit dem FIF werden die auf Membran gebrachten Proteine mit 1-ethyl-3'-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid-

hydrochlorid (EDC) und Ethylendiamin-dihydrochlorid modifiziert. Durch diese Behandlung reagieren Carboxylgruppen zu primären Aminen (siehe Abb. 2.3).

## **2.2 Entwicklung einer Färbemethode mit FIF für Membranen**

Als Grundlage für die Anwendung des FIF mit Membranen sollten zunächst die Bedingungen getestet werden, unter denen eine Färbung möglich ist.

### ***2.2.1 Detektion der Färbung mit FIF***

Die Detektion der Färbung wurde jeweils mit einer CCD-Kamera (Photometrics LCU1) durchgeführt, die an eine Dark-Box (Darktop, Fa. Progress Control) montiert ist, einen lichtisolierten Kasten, in dem Proben mit gewählten Wellenlängen belichtet werden können. Für Fluorescein und das verwendete Derivat FIF wurden die Membranstücke mit Licht einer Wellenlänge von etwa 480nm bestrahlt und die resultierende Fluoreszenz durch einen Filter für etwa 520nm von der Kamera aufgenommen. Die Kameraeinstellungen konnten per Software (IPLab Spectrum 3.1, Fa. Signal Analytics Corp.) auf einem angeschlossenen Computer gesteuert und die resultierenden Bilder abgespeichert werden. Das Kameraobjektiv (AF Nikkor, Fa. Nikon) mußte per Hand eingestellt werden. Für alle Aufnahmen wurde die Blende 8 verwendet und das jeweilige Objekt scharf eingestellt. Sobald der gewünschte Bildausschnitt zu sehen war, wurden die Belichtungsdauer und die Verstärkung (Gain) gewählt. Für die Messungen wurde ein etwa 20cm x 20cm großes Stück schwarze Pappe mit Haushaltsfolie überzogen, auf das die Membranen gelegt wurden.

### ***2.2.2 Modellproteine***

Als phosphorylierte Modellproteine wurden Ovalbumin, Casein und Phosvitin, als nicht phosphorylierte Proteine Glucoseoxidase und Lysozym gewählt. Diese Auswahl erfolgte im wesentlichen nach Verfügbarkeit. Ovalbumin, Phosvitin und Casein sind darüber hinaus auch in der Fe(III)-Chelat-Chromatographie als Modellproteine bekannt (Andersson-L und Porath-J 1986, Muszynska-G et al. 1986 und 1992).

### **2.2.3 Aufbringen der Proteine auf Membranen**

Für die Entwicklung der Färbemethode wurden von den Membranen etwa 1 bis 2cm<sup>2</sup> große längliche Stücke ausgeschnitten. Auf diese wurden per Hand die jeweiligen Proteinprobelösungen in Mengen von 0,5µl oder 1µl aufpipettiert. Die Fläche, die die Probe letztlich bedeckte, war neben dem Probenvolumen auch davon abhängig, ob die Membran trocken oder benetzt war, da im letzteren Fall die Proteine, bevor sie an der Membran hafteten, verlaufen konnten. Auf Nitrocellulosestücke wurden die Probelösungen deshalb trocken aufgebracht. PVDF ist im trockenen Zustand hydrophob und muß darum vor dem Auftrag einer wässrigen Lösung mit Methanol benetzt werden. Deshalb wurden hier mittels kleiner Methanolvolumina lokal begrenzte Bereiche hydrophilisiert und vor dem erneuten Trocknen die Proben darauf aufgetragen. Die frisch bespotteten Membranstücke wurden getrocknet, bevor sie für die Färbung benutzt wurden.

### **2.2.4 Lichtschutz**

Da Fluorescein lichtempfindlich ist, wurde die Färbung zunächst im abgedunkelten Raum durchgeführt. Ein Test ergab später, daß zwar Tageslicht FIF bleicht, normales Raumlicht über einige Stunden aber nicht (Ergebnis nicht gezeigt). Daraufhin wurde in Innenräumen ohne Tageslicht gefärbt und nur dann vor Licht geschützt, wenn eine Probe durch Tageslicht transportiert werden mußte.

### **2.2.5 Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin**

Bespottete Membranstücke wurden z.T. zum Abreagieren der Carboxylgruppen von Proteinen mit 1-ethyl-3'-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) (siehe 2.1.2.2) und Ethylendiamin behandelt. Dazu wurden sie ggf. mit Methanol hydrophilisiert und anschließend in 0,1M MES-Puffer pH5,0 äquilibriert. Nach 2h im gleichen MES-Puffer mit 500mM Ethylendiamin-dihydrochlorid und 50mM EDC wurden sie im MES-Puffer mit 50mM Ethylendiamin-dihydrochlorid dreimal 5 min gewaschen und in 50mM MES-Puffer mit 1M NaCl pH6,0 überführt und darin mindestens 10 min belassen, bevor sie gefärbt wurden.

### **2.2.6 Membranmaterial**

Als Probenproteine für diesen Versuch wurden Ovalbumin als Phosphoprotein und Glucoseoxidase als nicht phosphoryliertes Protein gewählt. Beide wurden als Lösungen von 1mg/ml und 5mg/ml in 50mM MES mit 1M NaCl pH6,0 angesetzt und je 0,5µl beider Probenkonzentrationen und 2µl der 5mg/ml - Lösungen getrennt nach den Proteinen auf die verschiedenen Membranstücke pipettiert (siehe 2.2.3). Es wurden PVDF-, Nitrocellulose- und positiv geladene Nylon-Membranen für den Test verwendet, da diese als Blotmembranen gängige Materialien sind. Die bespotteten Membranstücke wurden mit EDC/Ethylendiamin behandelt (siehe 2.2.5 und 2.1.2.2), in 0,05% einer FIF-Lösung mit 0,2mg/ml DMSO (Dimethylsulfoxid) im MES-Puffer über Nacht gefärbt, zweimal 15min mit dem gleichen Puffer ohne FIF nachgewaschen und detektiert.

### **2.2.7 Temperaturabhängigkeit**

Um die gewünschte Temperatur bei der Färbung zu erhalten, wurden die Membranen in einem Trockenschrank (ULE 400, Fa. Memmert) gefärbt. Es wurden die Phosphoproteine Ovalbumin und Phosvitin und die nicht phosphorylierten Proteine Glucoseoxidase und Lysozym getestet. Von allen Proteinen wurden jeweils 0,5µl einer 5mg/ml Lösung (in 50mM MES, 1M NaCl, pH6,0) auf Nitrocellulosemembranstücke aufpipettiert. Die Proben wurden alle mit EDC/Ethylendiamin behandelt (siehe 2.2.5 und 2.1.2.2). Die Färbungen (wie zuvor, siehe 2.2.6) wurden, nachdem die Membranstücke in dem MES-Puffer äquilibriert worden waren, bei 20, 30, 40, 50, 60, 70 und 80°C über folgende Zeiträume durchgeführt: 5, 10, 20, 30, 60 min. Nach zweimal 15min Waschen im MES-Puffer ohne FIF wurde die Fluoreszenz detektiert.

### **2.2.8 Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin und BSA**

PVDF-Membranstücke wurden mit jeweils 0,5µg Casein, Ovalbumin und Glucoseoxidase (in 50mM MES, 1M NaCl, pH6,0), Nitrocellulosemembranstücke zusätzlich mit Lysozym bespottet. Von beiden bespotteten Membranmaterialien wurden einige 15min in 10mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7,5 äquilibriert und anschließend 2h bei Raumtemperatur auf einem Gelschwenker im gleichen Puffer mit 2% BSA inkubiert. Zusammen mit nicht mit BSA geblockten Membranen wurden sie mit EDC/Ethylendiamin behandelt (siehe 2.2.5 und 2.1.2.2) und schließlich zusammen mit unbehandelten Membranstücken entweder bei 80°C oder 30°C eine Stunde gefärbt (wie zuvor, siehe 2.2.6), zweimal 15min in 50mM MES, 1M NaCl, pH6,0 gewaschen und die Fluoreszenz detektiert.

### 2.2.9 pH-Wert-Einfluß

MOPS ist MES in der chemischen Struktur sehr verwandt, aber in einem höheren pH-Bereich puffernd. Deshalb wurde es für pH-Werte von 6,5 bis 7,75 eingesetzt. Dabei sollte der überschneidende pH-Bereich zeigen, ob dennoch Unterschiede zu verzeichnen sind.

Die Färbung wurde bei 70°C durchgeführt. Dafür ist zu beachten, daß der pH-Wert der Puffer von der Temperatur abhängig ist. Für MES-Puffer gilt, daß eine Erhöhung der Temperatur um 1°C eine Erniedrigung des pH-Wertes um 0,011 bewirkt. Für MOPS liegt der Wert bei 0,013/1°C (Holtzhauer-M 1995). Die unten angegebenen pH-Werte wurden daher bei Raumtemperatur (20°C), aufgrund der Differenz von 50°C zur Färbetemperatur, um 0,55 Einheiten für MES, bzw. 0,65 Einheiten für MOPS, höher angesetzt.

Die Färbungen wurden über eine Stunde mit folgenden Puffern durchgeführt:

50mM MES, 1M NaCl	pH 5,5 / 5,75 / 6,0 / 6,25 / 6,5 / 6,75	(pH bei 70°C)
50mM MOPS, 1M NaCl	pH 6,5 / 6,75 / 7,0 / 7,25 / 7,5 / 7,75	(pH bei 70°C)

Aufgetragen wurden je 1µl von entweder 1mg/ml- oder 2,5mg/ml- Lösungen aus Ovalbumin, Casein, Glucoseoxidase und Phosvitin (in 50mM MES, 1M NaCl, pH6,0). Lysozym ging nach dem Auftauen der gelagerten Probe nicht wieder in Lösung, so daß vom Überstand über dem Pellet eine unbekannte Menge aufgebracht wurde. Nach der Färbung mit 0,05% einer FIF-Lösung mit 0,2mg/ml DMSO wurden die Proben in 50mM MES mit 1M NaCl pH 5,5 (bei 20°C) nachgewaschen und die Fluoreszenz detektiert.

### 2.2.10 Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration

Nitrocellulosemembranen wurden mit je 0,5 oder 0,25µg Ovalbumin, Casein, Glucoseoxidase, Phosvitin und Lysozym (in 50mM MES, 1M NaCl, pH6,0) bespottet. Die Färbungen wurden jeweils für 60 min bei 70°C mit folgenden Konzentrationen der FIF-Lösung (0,2mg/ml DMSO) durchgeführt:

0,01 % / 0,1 % / 0,5 % / 5 % / 10 %      in 50mM MES mit 1M NaCl pH 6,0 (der pH-Wert wurde für 70°C eingestellt - siehe 2.2.9)

Es wurde zweimal 15min im MES-Puffer ohne FIF gewaschen und zuletzt die Fluoreszenz detektiert.

### **2.2.11 Färben eines Blots mit den Modellproteinen**

Um zu zeigen, daß die bisherigen Färbungsergebnisse bei einem Blot anwendbar sind, wurden mit einer Mini-PROTEAN II-Gelelektrophoreseapparatur (BioRad) SDS-Gele mit den Modellproteinen hergestellt, auf Nitrocellulose geblottet und gefärbt.

Gele mit 7,5% Acrylamid im Trennteil und 5% im Sammelgel wurden gegossen. Das Trenngel bestand aus 25% Trenngelpuffer (0,5M Tris, 0,4% SDS pH8,8), 25% Bis/Acrylamid-Lösung (30%ig), 0,5% Ammoniumpersulfat-Lösung (10%ig) und 0,005% TEMED in MilliQ-Wasser. Das Sammelgel wurde aus 23% Trenngelpuffer (0,5M Tris, 0,4% SDS, pH6,8), 16,7% Bis/Acrylamid-Lösung (30%ig), 0,9% Ammoniumpersulfat-Lösung (10%ig) und 0,009% TEMED in MilliQ-Wasser gemischt. Auf die fertigen Gele wurden folgende Proben aufgetragen:

Je 6µl SDS-Molekulargewichtsmarker (BioRad Prestained broad range), je 8µl der Proteinlösungen (1mg/ml SDS-Puffer: 62,5mM Natriumphosphat pH7,0 mit 10% Glycerin, 2% SDS, 5% DTT und 0,001% Bromphenolblau) von Casein, Ovalbumin, Glucoseoxidase, Lysozym, Phosvitin, ein Gemisch aus je 5µl aller Modellproteinlösungen und 30µl einer EL-4 6.1-Proteinprobe (diese Probe brachte keine weiteren Erkenntnisse und wird hier daher nicht weiter erläutert). (Alle Proben wurden vor dem Gelauftrag 5min aufgekocht).

Die beladenen Gele wurden in die Laufkammer mit Laufpuffer (25mM Tris, 190mM Glycin, 0,1% SDS) gegeben und bis zum Probeneintritt in das Trenngel zunächst eine Spannung von 60V, dann von 200V angelegt.

Die Gele wurden entnommen und die Proteine mit einer Semidry-Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Cell von BioRad) für 15min bei 15V auf Nitrocellulose geblottet. Dafür wurden auf der unteren (anodischen) Bloteinheit je zwei Lagen Saugpapier (Whatman 3MM Chr) mit der Membran, dem Gel und zwei weiteren Lagen Saugpapier überschichtet und dann die obere Bloteinheit aufgesetzt. Zuvor wurden alle Schichten 10min in Blotpuffer (50mM Tris mit 380mM Glycin, 0,1% SDS und 20% Methanol) äquilibriert.

Die Membranen wurden mit EDC/Ethylendiamin behandelt (siehe 2.2.5 und 2.1.2.2) und anschließend 30min in 50mM MES, 1M NaCl, pH 6,0 mit 0,05% FIF-Lösung (0,2mg/ml DMSO) entweder bei 30°C oder 70°C gefärbt. Vor der Detektion der Fluoreszenz wurde noch zweimal 15min mit dem MES-Puffer gewaschen.



### 2.3 Kapillarelektrophorese

Es sollte getestet werden, ob FIF als Marker von Phosphoproteinen bei der Kapillarelektrophorese (CE) angewendet werden kann. Die wesentliche Frage war, ob der Bindungskomplex aus Chelator, Metallion und Phosphoprotein unter elektrophoretischen Bedingungen beständig ist.

Für die Arbeiten mit der CE wurde eine Biofocus 2000 (BioRad) mit Laser induzierter Fluoreszenz - Detektion (LIF) verwendet. Die Kapillare war unbeschichtet, hatte einen Innendurchmesser von 50µm und war 24 cm lang. Die Temperatur sowohl der Kapillare als auch des Probenraumes betrug 20°C. Alle verwendeten Puffer wurden nach Fertigstellung durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2µm filtriert. Als Laufpuffer wurde 25mM MES-Puffer pH 6,0 verwendet. Die Proben wurden jeweils in 25mM Ammoniumacetat-Puffer 1M NaCl pH 6,0 angesetzt. Vor ihrem Einsatz wurden alle Lösungen in den Probengefäßen zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen.

Vor den Elektrophoresen wurde die Kapillare 30 Sekunden mit 0,1M NaOH, dann 1 min mit dem Laufpuffer gespült.

Die Proben wurden mit Druck (Einstellung: 10psi\*sec) in die Kapillare eingebracht. Nach der Probeninjektion wurde das Injektionsende der Kapillare zur Reinigung kurz in ein Extragefäß mit Laufpuffer geführt. Anschließend wurde eine Spannung von 10kV, mit der Kathode am Injektionsende, angelegt.

Die Proben wurden frisch angesetzt und dann in mehreren Elektrophoresen nacheinander getestet. Die Probenkonzentration betrug 5mg Protein / ml Probenpuffer, der mit 5% einer FIF-Lösung von 0,2mg/ml DMSO ergänzt war.

### 2.4 Produktion von Interleukin-1 mit dem E.coli-Stamm CAG pIL-1β3

Für die Arbeiten mit dem Modellsystem der frühen Interleukin-1-Signalwege sollte IL-1β mit dem E.coli-Stamm CAG pIL-1β3 produziert werden.

Das Medium aus 1 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl wurde autoklaviert und mit 0,1% sterilfiltrierter Ampicillinlösung (10%ig in MilliQ-Wasser) ergänzt.

Eine Stammampulle mit 2ml CAG pIL-1β3 (freundlicherweise von Dr. Mahavir Singh, Technische Universität Braunschweig, zur Verfügung gestellt) wurde in 1l Medium gegeben und bei 37°C und 120UPM (INFORS HT Schüttelinkubator, Fa. INFORS AG) inkubiert. Die Zelldichte wurde über die

optische Dichte bei 578nm ( $OD_{578}$ ) (Pharmacia Novaspec II mit sterilem Medium als Referenz) beurteilt. Ein Wert von 0,1 wurde als Anfangsdichte nach dem Überimpfen auf einen Produktionsansatz gewählt. Bei  $OD_{578} = 0,55$  wurde die IL-1-Produktion mit 0,22% Indolacrylsäure-Lösung (1,55% Indolacrylsäure in Ethanol) stimuliert. Die Zellen erreichten noch etwa eine Dichte von  $OD_{578} = 1,2$  und wurden dann geerntet. Dazu wurden sie 30min bei 9000 UPM und 4°C abzentrifugiert (J2-21 Centrifuge, Fa. Beckmann mit JA-10-Rotor). Je 1g Pellet wurden 1,2 ml 100mM Tris/HCl pH 8,0 mit 2,5mM EDTA und 0,1mM PMSF zugegeben. Für den Aufschluß wurden die Zellen mit einer French Pressure Cell (Aminco FA-003) dreimal behandelt. Zur Beurteilung des Produktionserfolges wurde eine 1:50-Verdünnung des Aufschlusses in SDS-Probenpuffer aufgekocht, davon ein SDS-Mini-Gel angefertigt und silbergefärbt (siehe 2.4.1).

Für die Arbeit wurden, nach den Vortests zur Bestimmung eines geeigneten Mediums (1% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl) und zur Übertragbarkeit auf größere Dimensionen im Litermaßstab, 100l CAG pIL-1 $\beta$ 3 fermentiert. Dazu wurde 1l Medium mit einer Stammampulle mit 2ml angeimpft, inkubiert und bei einer  $OD_{578} = 1$  in einen 15l - Fermenter (Fa. Giovanola Frères) gegeben. Dessen Inhalt wurde nach Erreichen etwa der gleichen  $OD_{578}$  auf den 150l - Fermenter (Fa. MBR) überimpft. Bei einer  $OD_{578}$  von etwa 0,55 wurde die Kultur mit Indolacrylsäurelösung (s.o.) stimuliert und die Fermentation 18h später beendet. Die Zellen wurden dann von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bioreaktionstechnik der GBF unter der Leitung von Dr. Anton Ross, die während des gesamten Fermentationsprozesses freundlich unterstützend zur Seite standen, aus dem Fermenter entnommen, abzentrifugiert und eingefroren. Dr. Jens Paulsen und seine Mitarbeiter aus der Arbeitsgruppe GMP Technikum der GBF reinigten das IL-1 dann freundlicherweise aus den Proben chromatographisch auf. Das gewonnene IL-1 wurde mit einer Konzentration von 0,34mg/ml eingefroren.

### 2.4.1 Silberfärbung für Phastgele

Die Phastgele wurden nach folgendem Färbeprogramm mit der Färbereinheit für das PhastSystem gefärbt:

1. 3min, 20°C	3,45% Sulfosalicylsäure, 11,5% Trichloressigsäure, 30% Methanol
2. 1 und 3min, 50°C	5% Methanol
3. 2 x 30sec 50°C	50% Methanol, 10% Essigsäure
4. 6min 50°C	40% Glutaraldehyd (25%ig)
5. 2,5min und 4min 50°C	50% Methanol, 10% Essigsäure
6. 2 und 3min 50°C	MilliQ-Wasser
7. 5min 40°C	20mM NaOH, 1,5% Ammoniaklösung (25%ig), 0,4% Silbernitrat
8. 1,2min 30°C	MilliQ-Wasser
9. 0,5 und 3,2min 30°C	0,05% Citronensäure, 0,05% Formaldehyd (37%ig)
10. 1,5min 50°C	10% Essigsäure
11. 1,4min 50°C	10% Glycerin (87%ig)

## 2.5 Arbeiten mit tierischen Zellen

Für die Arbeiten mit dem Modellsystem der frühen Interleukin-1-Signalwege wurde mit dem Maus-T-Zell-Stamm EL-4 6.1 gearbeitet (siehe 1.2.5). Dazu war die Kultivierung dieser Zellen in verschiedenen Größenordnungen notwendig.

### 2.5.1 Kulturmedien und Kulturbedingungen

Für eine Standardhaltung der Zellen wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 41966, Fa. Gibco BRL) mit 5% FCS (fötales Kälberserum) verwendet.

Für die Fermentation der EL-4-Zellen (siehe 2.5.6) wurde ZKT-1-Medium (GBF-eigene Mischung) mit 2,5% FCS eingesetzt.

Als Kulturbedeälter wurden entweder sterile Einweg-Kulturplastikflaschen oder 6-Well-Plates verwendet.

### **2.5.2 Auftauen der Zellen**

Eine in einem Kryoröhrchen tiefgefroren gelagerte Kultur wurde zum Auftauen im 37°C-Wasserbad gewärmt, bis kaum noch Eiskristalle zu sehen waren. Anschließend wurden sie zügig in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und langsam mit 30 ml Medium (mit 10% FCS) beschickt. Nachdem sie 5 min bei 200 x g abzentrifugiert worden waren, wurden sie erneut in 30 ml Medium (mit 10% FCS) aufgenommen und in einer Zellkulturflasche bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.5.3 Pflege der Zellen**

Die EL-4 6.1-Zellen wurden alle 2-3 Tage umgesetzt, wenn sie eine Zellzahl von etwa  $2 \times 10^6$  Zellen / ml erreichen. Dazu wurden sie gezählt und mit frischem Medium auf eine Zahl von in der Regel  $1 \times 10^5$  Zellen / ml verdünnt.

### **2.5.4 Zählen der Zellen**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Zellen der Kultur entnommen und je nach abgeschätzter Menge 1:2 oder 1:10 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung verdünnt. Von der Verdünnung wurden zwei Großquadrate einer Zellzählkammer (Neubauer) ausgezählt und entsprechend dem damit ausgezählten Volumen nach folgender Formel die Zellzahl berechnet:

$$\frac{\text{Zahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10\,000}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} = \text{Zellen / ml}$$

Dabei konnten tote Zellen daran erkannt werden, daß sie den Farbstoff annahmen und so von lebenden unterschieden werden. Der Faktor 10 000 resultiert aus dem Volumen über einem Großquadrat (1 mm x 1 mm x 0,1 mm).

### **2.5.5 Einfrieren der Zellen**

Zum Einfrieren wurden Zellen in exponentieller Wachstumsphase verwendet.  $0,5-1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO) aufgenommen, nachdem sie 5min bei  $200 \times g$  abzentrifugiert worden waren. Anschließend wurden sie zunächst über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren, bevor sie entweder bei  $-70^\circ\text{C}$  oder für einen längeren Zeitraum bei  $-196^\circ\text{C}$  über flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

### **2.5.6 Produktion von EL-4 6.1 im Fermenter**

Zur Produktion größerer Zellmengen wurde die Zelllinie EL-4 6.1 in einem Reaktor kultiviert. Dieser arbeitete mit blasenfreier Begasung und Perfusion mittels einer Membran, die um die Rührereinheit gewickelt war. Der 2,5l Doppelglasmantel (Karlsruher Glastechnisches Werk, Karlsruhe) war des weiteren mit einer Sauerstoffelektrode (Ingold, Urdorf, Schweiz) und einem Rohr zur Probenentnahme ausgestattet. Zur Regulierung der Wachstumsbedingungen waren ein Thermostat (Kompaktthermostat MS3, Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen), eine Abgasflasche (Sterilbarriere) und eine Begasungseinheit mit  $\text{pO}_2$ -Regler und Gasmischstation (GBF-Eigenbau) angeschlossen. Die Befüllung unter Perfusionsbedingungen wurde über eine Füllstandssonde und einen Leitfähigkeitsgrenzwertschalter (Vegator 4331, Vega, Schiltach) geregelt. Diese steuerten mit zwei Peristaltikpumpen (Watson-Marlow 501 U/R, Petro Gas, Berlin) das Befüllen des Fermenters aus einer Vorratsflasche mit Frischmedium und das Auslassen in eine leere Flasche für verbrauchtes Medium. Die Perfusionsgeschwindigkeit konnte durch eine Waage (BP3100S, Fa. Sartorius), auf der die leere Flasche stand, verfolgt werden. Über eine Inokulumflasche wurde der Fermenter mit 300ml Zellkultur beschickt. Die Anfangszelldichte betrug etwa  $2 \times 10^5$  Zellen/ml. Als Medium wurde ZKT-1 (GBF-eigene Mischung) mit 2,5% FCS verwendet. Der  $\text{CO}_2$ -Gehalt wurde auf 8,5% reguliert, der  $\text{O}_2$ -Gehalt automatisch in Abhängigkeit des Bedarfs.

Alle 2-3 Tage wurde die Zellzahl mit einer Trypanblau-Färbung in einer Zellzählkammer bestimmt. Bei etwa  $1 \times 10^7$  Zellen/ml wurden 2000-2400ml der Kultur geerntet.

Die Fermentation wurde mit der freundlichen Unterstützung von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik unter der Leitung von Dr. Roland Wagner durchgeführt.

### **2.5.7 Stimulierung der Zellen mit Interleukin-1**

Für die Stimulierung wurde das selbst produzierte IL-1 $\beta$  verwendet. Nach Martin-M et al. (1994) wurden die Zellen mit 10ng IL-1 / ml Medium beschickt und 10 Min bei 37°C inkubiert. Die Zelldichte wurde dabei, im Gegensatz zu Martin-M et al., nicht auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, sondern bei der Erntedichte belassen. Bei Flaschenkulturproben wurden also etwa  $2 \times 10^6$  und bei Fermentationsproben  $1 \times 10^7$  Zellen/ml stimuliert.

### **2.5.8 Verarbeitung der Zellernte zur Lagerung**

Stimulierte und nicht stimulierte Zellen wurden bei 4°C 6min mit 200xg abzentrifugiert, mit PBS (10mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 mit 138mM NaCl, 3mM KCl) beschickt und erneut zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen wurden sie ohne Überstand bei -70°C eingefroren.

## **2.6 Immunopräzipitation von IL-1RI und Kinaseassays**

Zur Untersuchung der Proteine der frühen Signaltransduktionskaskade von IL-1 wurde mit einem anti-IL-1RI-Antikörper, der die Signaltransduktion nicht behindert, der IL-1RI-Komplex aus lysierten EL-4-Zellen zunächst spezifisch gebunden. Anschließend wurde durch Zugabe von Sepharose, an die Protein G gebunden war, der Komplex vom restlichen Zelllysats abgetrennt (Immunopräzipitation). Schließlich wurden mit dem isolierten Immunopräzipitat verschiedene Kinaseassays durchgeführt.

### **2.6.1 Immunopräzipitation**

Antikörper: gereinigter monoklonaler Ratte-anti-Maus-IL-1RI-Antikörper (TypI/p80), Klon 12A6, 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l (Pharmingen)

Protein G-Sepharose-Suspension:

Die Protein G-Sepharose-Lösung wurde 1:1 mit PBS (10mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 mit 138mM NaCl, 3mM KCl) gemischt und 2min bei 1000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Sepharose erneut zweimal mit PBS, dann zweimal mit dem gleichen Volumen Lysepuffer (50mM Tris, pH 7,4, 50mM NaCl, 1% (w/v) Brij 97) nachgewaschen. Schließlich wurden die Beads im gleichen Volumen Lysepuffer aufgenommen und sofort weiter verarbeitet.

Zur Isolierung einer Präzipitations-Einheit des IL-1RI-Komplexes wurden je  $1 \times 10^7$  mit PBS gewaschene EL-4 6.1-Zellen (siehe 2.5.8) zunächst in jeweils 750  $\mu$ l kaltem Lysepuffer bei 4°C 30 min unter Schütteln lysiert. Anschließend wurde die Probe abzentrifugiert (20000 x g, 4°C) und der Überstand mit anti-IL-1RI-Antikörper versetzt (die Menge wurde optimiert (siehe 2.6.2) und schließlich auf 0,3  $\mu$ g je Einheit festgelegt). Das Lysat wurde über Nacht erneut bei 4°C geschwenkt und dann mit jeweils 50  $\mu$ l Protein G-Sepharose-Bead-Suspension ergänzt. Nach 4 weiteren Stunden Schütteln wurden die Beads über eine Leersäule abgetrennt und mit Lysepuffer nachgewaschen. Je nach Menge wurde dafür entweder die leere Hülle (mit Fritte) einer NAP-5- oder einer PD-10-Säule (Pharmacia) verwendet. Wenn nur einzelne Präzipitations-Einheiten verarbeitet wurden, wurden die Beads für jeweils 2 min bei 1000 x g zentrifugiert und die Überstände abgenommen.

### ***2.6.2 Optimieren der Antikörpermenge für die Immunopräzipitation***

Um den Verbrauch der kostenintensiven IL-1RI-Antikörper möglichst gering zu halten und das selbst produzierte IL-1 und die EL-4-Zellen zu testen, wurden stimulierte und nicht stimulierte Proben der EL-4-Produktion aufgetaut und daraus IL-1RI-Immunopräzipitat-Einheiten erzeugt (siehe 2.6.1). Dabei wurde die Antikörpermenge je Präzipitations-Einheit wie folgt variiert:

0,01  $\mu$ g / 0,025  $\mu$ g / 0,05  $\mu$ g / 0,1  $\mu$ g / 0,3  $\mu$ g / 0,5  $\mu$ g / 1  $\mu$ g

Die Beads mit dem Präzipitat wurden mit mehreren Eigenvolumina Kinasepuffer (20mM HEPES, pH 6,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM MnCl<sub>2</sub>) gewaschen, bis der Überstand keine Schaumentwicklung durch das Brij 97 mehr zeigte und dann 1h bei 30°C im gleichen Puffer mit 0,5  $\mu$ Ci  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP je Einheit inkubiert. Anschließend wurden je 25  $\mu$ l des Assaygemisches mit den Beads in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit einer integrierten Phosphocellulosemembran (Phosphocellulose-Unit, Fa. Pierce) gegeben und 2min bei 20000 x g abzentrifugiert. Die Beads wurden zweimal mit je 500  $\mu$ l 75mM Phosphorsäure nachgewaschen, mit der Phosphocellulose-Einheit in ein Szintillationsgefäß überführt, mit 9ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Berthold BF Betaszint 5000) vermessen.

### 2.6.3 Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel

Da in späteren Versuchen Kinaseassays mit am IL-1RI assoziierten Kinasen durchgeführt werden sollten (siehe 2.8.1), wurde eine Regenerierung der Kinasen in SDS-Gelen vom IL-1RI-Komplex mit und ohne zusätzlichem Substrat (Histon1 und Myelin Basic Protein) durchgeführt. Damit war feststellbar, ob sich tatsächlich Kinasen im Komplex befanden. Darüber hinaus ließ sich erkennen, ob diese sich ggf. selbst phosphorylierten.

Es wurden 10%ige SDS-Gele mit 5%igem Sammelgel hergestellt (Grundrezept wie unter 2.2.11, aber 33,3% Bis/Acrylamid-Lösung (30%ig) im Trenngel), wobei entweder je 0,5mg Histone1 und Myelin Basic Protein je Milliliter Gellösung als Kinasesubstrate mit einpolymerisiert wurden (Gel Typ 1), oder darauf verzichtet wurde (Gel Typ 2). Immunobeads von mit IL-1 stimulierten und nicht stimulierten Zellen (jeweils 150 Immunopräzipitateinheiten) wurden 5min in SDS-Probenpuffer (0,2M Tris/HCl pH 6,8 mit 1% SDS, 2% DTT, 1mM EDTA und 0,01% Bromphenolblau) gekocht. Eine Fraktion der Immunobeads von stimulierten Zellen (150 Immunopräzipitateinheiten) wurde in dem SDS-Probenpuffer bei Raumtemperatur 1h geschüttelt. Nachdem die Beads sich wieder abgesetzt hatten, wurden die Überstände mit Mikrokonzentratoren (Amicon centricon 10) aufkonzentriert, bis die Kontrolle mit Minigelen (Pharmacia PhastSystem mit 8-25%igen SDS-Gelen und Silberfärbung (siehe 2.4.1) mit zugehöriger Färbeapparatur) zeigte, daß die Konzentration für SDS-Gele ausreichend war. Die Proben (jeweils 65 Immunopräzipitateinheiten auf das Gel mit, 85 auf das ohne zusätzliches Substrat) wurden neben Proteingrößenstandards (low molecular weight prestained, Fa. BioRad und Radioaktivmarker [ $^{14}\text{C}$ ]methylierte Standardproteine, Fa. Amersham) auf die 10%igen Gele aufgetragen. Bis zur Erreichung des Trenngels durch die Proben wurde eine Spannung von 60V angelegt, anschließend betrug sie 120V, bis die Bromphenolblaubanden am unteren Gelrand angelangt waren. Die Gele wurden entnommen und 60min in 20% Isopropanol in 50mM Tris/HCl pH 8 gegeben, wobei die Lösung nach 30min erneuert wurde. Sie wurden in 1mM DTT in 50mM Tris/HCl pH 8 überführt und darin ebenfalls 60min, mit einem Pufferwechsel nach 30min, belassen. Anschließend wurden die Proteine im Gel für 60min in 6M Guanidin-Hydrochlorid, 2mM EDTA, 20mM DTT in 50mM Tris/HCl pH 8 denaturiert und dann über Nacht bei 4°C in 1mM DTT, 2mM EDTA, 0,04% Tween 20 in 50mM Tris/HCl pH 8 renaturiert. Vor dem Assay wurden die Gele 60min in Kinasepuffer (20mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM  $\text{MnCl}_2$ , pH 6,5) äquilibriert.

Für den Kinaseassay wurde der Puffer gewechselt und je Milliliter Kinasepuffer wurden 0,5 $\mu\text{Ci}$   $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -



ATP zugegeben. Nach einer Stunde wurde der Assay gestoppt. Die Gele wurden mehrfach, je mindestens 30 Minuten, in 5% TCA, 1% Natriumpyrophosphat gewaschen, bis die Radioaktivität in der Waschlösung, die mit dem Szintillationszähler bestimmt wurde, vernachlässigbar war.

Bevor sie schließlich zwischen zwei Folien zum Trocknen gespannt wurden, wurden die Gele 1h in Glycerin gegeben. Die trockenen Gele wurden zur Detektion von Radioaktivität auf Film (X-omat AR, Fa. Kodak) aufgelegt. Die Entwicklung wurde mit einem Filmentwickler-Automaten (Protec M45, Fa. INTAS) durchgeführt.

## **2.7 Erstellen und Färben von 2D-Gelen und -Blots**

Es sollte festgestellt werden, ob sich anhand der Färbung von Blots mit Realproben Schlüsse auf die Tauglichkeit der FIF-Färbung ziehen ließen. Dazu wurden 2D-Gele von EL-4 6.1-Gesamtlysats angefertigt, zum Teil geblottet und gefärbt.

### ***2.7.1 Markierung von Zellen mit $^{33}\text{P}$***

Um Proteine zu erfassen, die auf eine Stimulanz hin phosphoryliert werden, wurden Zellen mit radioaktivem Phosphat markiert. Dazu wurden sie mit 250  $\mu\text{Ci}$   $^{33}\text{P}$ -Orthophosphat / ml Medium beschickt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

### ***2.7.2 Probenaufarbeitung für 2D-Gele***

IEF-Lösung: 7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 4% CHAPS, 0,02% Tris, 1% Pharmalyte, 30mM DTT, 1mM Pefablock, 5\*10<sup>-5</sup>% Leupeptin

Diese Lösung wurde vor dem Einsatz mit dem Ionentauscher Serdolit MB-1 versetzt und anschließend über einen Faltenfilter gegeben, um möglicherweise verunreinigende Harnsäure abzutrennen.

Zur Ernte von Zellen für die 2D-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden die Kulturen zweimal mit PBS (s.o.) gewaschen. Dazu wurden sie jeweils bei 200 x g abzentrifugiert. Je 1,7\*10<sup>7</sup> EL-4 6.1-Zellen wurden in 500  $\mu\text{l}$  IEF-Lösung durch 30 min Schütteln lysiert und anschließend 60min in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX Ultracentrifuge mit Rotor TLA 100.4 oder TLA 100.3, Fa. Beckmann)

mit 50000 UPM bei 18°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und frisch verwendet.

### **2.7.3 Erste Dimension der 2D-PAGE: Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die isoelektrische Fokussierung (siehe auch 2.1.1.1) der Gesamtzellproteinproben wurde auf 18cm-IPG-Streifen (immobilisierter pH-Gradient (Fa. Pharmacia)) pH-Bereich 3-10 durchgeführt. Mit Hilfe einer Quellschleife wurden über Nacht in jeden IPG-Streifen 490µl in IEF-Lösung aufgearbeiteter Zellprobe eingequollen. Dazu wurden die Proben in die Kammern einpipettiert, die Streifen aufgelegt und alles mit Paraffinöl (dünnflüssig) überschichtet. Die fertig gequollenen Streifen wurden in dem IEF-Gel-Aufsatz der Gelelektrophoreseapparatur aufgelegt und wieder mit Paraffinöl überschichtet. Die Elektrodenstreifen (Fa. Pharmacia) wurden mit deionisiertem Wasser getränkt und zwischen die Gelen und die Elektroden gelegt. Bei der Elektrophorese war die Spannung die limitierende Größe. Sie wurde nach folgendem Protokoll angelegt:

Von 0 auf 75V in 5min, von 75 auf 150V in 5min, von 150 auf 300 V in 4h, von 300 auf 1500V in 6h, von 1500 auf 3500V in 6h, dann mit 3500V bis zum Ende mit etwa 200kVh insgesamt.

Die Streifen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70°C eingefroren.

### **2.7.4 Zweite Dimension der 2D-PAGE: SDS-PAGE**

Es wurden 12%ige Polyacrylamid-Gele mit einer Größe von 20cm x 20cm gegossen. Dazu wurden 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%ig) und 25% Gelpuffer (1,5M Tris/HCl, pH 8,6) mit 5,75% Glycerin (87%ig) ergänzt und mit MilliQ-Wasser auf 100% aufgefüllt. Bevor die Lösung in die Gelvorrichtung gegeben wurde, wurden 0,0045% TEMED und 0,5% Ammoniumpersulfat-Lösung (10% in MilliQ-Wasser) zugefügt und untergemischt.

Kathodenpuffer: 25mM Tris, 200mM Glycin, 0,1% SDS

Anodenpuffer: 25mM Tris, 0,1% SDS

Äquibrierlösung: 6M Harnstoff, 50mM Tris/HCl pH 6,8, 100µM EDTA, 30% Glycerin, 2% SDS, 62mM DTT

Die fertigen IEF-Streifen wurden zweimal 15 min in der Äquibrierlösung geschwenkt. Beim zweiten Mal wurde die mit 260mM Iodacetamid und Bromphenolblau ergänzte Lösung verwendet.

Die Streifen wurden auf die SDS-Gele (siehe auch 2.1.1.1) aufgebracht und mit Agarose (1% in Kathodenpuffer) eingegossen. Über Nacht wurden schließlich bei 10°C insgesamt etwa 2000Vh angelegt, bis die Bromphenolblaubande knapp 18 cm vom oberen Gelrand gewandert war. Dann wurden die Gele entnommen und entweder geblottet (siehe 2.7.5 und 2.1.1.3) oder direkt silbergefärbt (siehe 2.7.7).

### **2.7.5 Blotten der 2D-Gele**

Die fertigen 2D-Gele wurden mit dem Semidry-Blotaufsatz der Gelelektrophoreseapparatur mit einem diskontinuierlichen Puffersystem geblottet. Dazu wurden je Blot 3 Lagen Saugpapier, 1 Blotmembran (je nach Bedarf aus Nitrocellulose oder PVDF) und das Gel auf 18 x 18 cm zurechtgeschnitten. Alle Komponenten wurden vor dem Blot einige Minuten im jeweiligen Puffer äquilibriert. Auf die anodische Bloteinheit wurde zunächst ein mit 0,3M Tris, 20%Methanol getränktes Saugpapier gelegt und darauf ein mit 25mM Tris, 20% Methanol getränktes geschichtet. Hierauf wurde die ebenfalls in 25mM Tris, 20% Methanol getränkte Membran, darauf wiederum das Gel aufgebracht, das in 40mM 6-Aminohexansäure, 20% Methanol und 0,01%SDS äquilibriert worden war. Ein auch in der letztgenannten Lösung inkubiertes Saugpapier bildete die letzte Schicht, bevor die Kathodeneinheit aufgelegt wurde. Damit Luftblasen den Proteintransfer nicht behinderten, wurden die Schichten jeweils mit sanftem Druck gewalzt und abschließend ein Gewicht auf die Blotkammer gelegt. Nach 30 min bei 400µA wurde das obere Saugpapier mit etwas frischem Puffer beträufelt und vorsichtig gewalzt. Nach weiteren 15 min wurde der Blot beendet. Die Gele wurden fixiert und zur Kontrolle zunächst mit Coomassie und dann, für eine bessere Beurteilung, mit Silber gefärbt (siehe 2.7.7). Die Membranen wurden 3 x 5 min in 0,9% NaCl gewaschen, getrocknet und bei 4°C gelagert.

### **2.7.6 Coomassie-Färbung**

Für die Coomassie-Färbung wurden die frisch geblotteten Gele mindestens 30min in 30% Ethanol, 10% Essigsäure mit 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-350 gegeben, bis Proteinspots gut zu erkennen waren. Anschließend wurden sie einige Stunden in 30% Ethanol und 10% Essigsäure gelagert und schließlich silbergefärbt (siehe 2.7.7).

Die Färbung mit Coomassie ermöglicht schnell eine grobe Beurteilung des Blotergebnisses und bringt, vor der sensitiveren Silberfärbung durchgeführt, bei dieser ein gleichmäßigeres Färbeergebnis (DeMoreno-MR et al. 1985).

### **2.7.7 Silberfärbung**

Die mit Coomassie gefärbten Gele wurden für mindestens 1h in 30% Ethanol, 6,8% (w/v) Na-Acetat, 0,5% Glutaraldehyd (25%ig), 0,2% (w/v) Na-Thiosulfat gegeben, bevor sie dreimal 5min in deionisiertem Wasser gewaschen wurden. Nachdem sie dann 20-60min in 0,5% (w/v)  $\text{AgNO}_3$ , 0,02% Formaldehyd (37%ig) inkubiert worden waren, wurden sie 1min in deionisiertem Wasser gewaschen, um anschließend mit 2,5% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,01% Formaldehyd (37%ig), mit  $\text{NaHCO}_3$  auf pH 11,5 gebracht, entwickelt zu werden, bis die Proteinspots gut zu erkennen waren (etwa 5-10min). Die Färbung wurde dann mit 1% Glycin 10min gestoppt. Vor dem Inkubieren in 25% Glycerin wurden die Gele noch dreimal 5min in deionisiertem Wasser gewaschen.

Von den gefärbten Gelen wurden mit einem Scanner Aufnahmen gemacht, bevor sie zwischen Folien oder zwischen einer Folie und Whatmanpapier mit Hilfe eines Vakuumgeltrockners getrocknet wurden. Radioaktiv markierte Gele wurden dann auf Phosphoscreens (Fa. Fuji) gelegt, die nach ausreichender Zeit mit einem Phosphoimager (BAS 5000 Phosphor Imaging System, Fa. Fuji) ausgelesen wurden.

### **2.7.8 Indische-Tinte-Färbung (Membranfärbung)**

Die Färbung wurde als Vergleichsfärbung verwendet und erst als letzte durchgeführt, da sie die anderen Färbungen hätte beeinflussen können.

Nitrocellulose-Membranen wurden zunächst in deionisiertem Wasser hydratisiert. Anschließend wurden sie für mindestens 2-3h in 0,1% Indische Tinte und 0,5% Tween 20 in 1% Essigsäure (filtrierte Lösung) gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Membranen mit einem PC-Scanner gescannt.

### **2.7.9 FIF-Färbung**

Die Blots der 2D-Gele (auf Nitrocellulosemembranen) wurden zunächst in 50mM MES mit 1M NaCl, pH 6 (pH auf 60°C eingestellt, siehe 2.2.9) äquilibriert und anschließend 1h bei 60°C mit 0,05% FIF im MES-Puffer gefärbt. Vor der Detektion wurden sie dreimal je 10min mit dem gleichen MES-Puffer ohne FIF nachgewaschen. Die Detektion wurde erst bei pH 6 im MES-Puffer und anschließend bei pH 9 in 100mM Tris/HCl durchgeführt. Für die basische Detektion wurden die Membranen jeweils in feuchtem Zustand, vorsichtig auf einige Milliliter Puffer, die auf die Detektionsunterlage (siehe 2.2.1)

gegeben wurden, aufgelegt. Dies sollte ein Ablösen und Diffundieren des Farbstoffes minimieren. Die gefärbten Membranen wurden später mit indischer Tinte gefärbt (siehe 2.7.8).

## 2.8 Färbung von Membranen nach Kinaseassays

### 2.8.1 Kinaseaktivität von *IL-1RI*-Immunpräzipitat auf Blot- und Peptidmembranen

Es sollte untersucht werden, ob mit Kinasen in einem Immunpräzipitat (hier von *IL-1RI*) Substrate auf Membranen phosphoryliert werden können. Als Substrate wurden ein 2D-Blot von EL-4-Lysat und eine Kinasesubstrat-Peptidmembran verwendet.

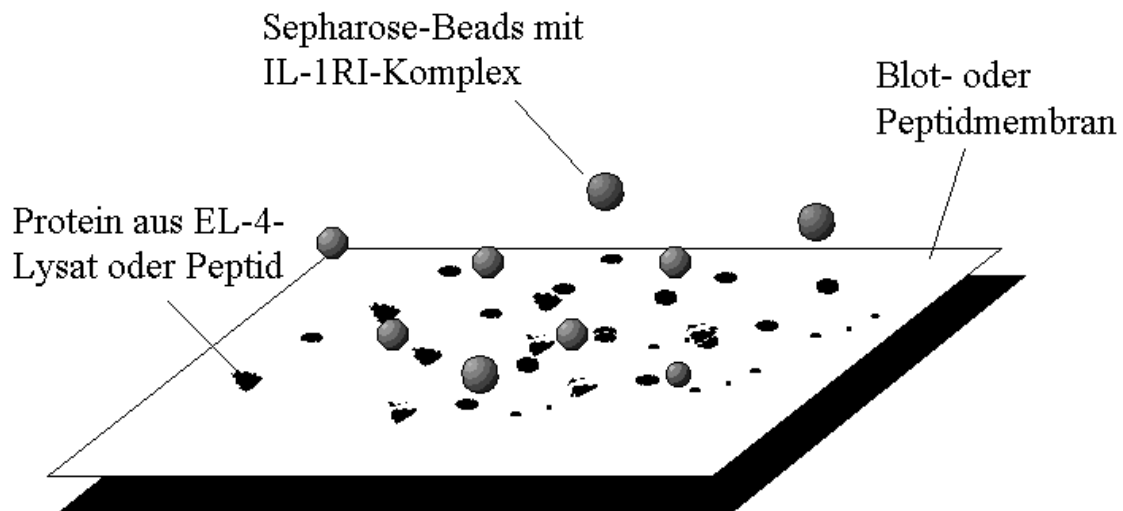


Abb. 2.4: Schema der Kinaseassays mit Immunpräzipitat auf einem Protein-Blot oder einer Peptidmembran

Abbildung 2.4 zeigt das Prinzip der Versuche. Die Kinasen aus dem *IL-1RI*-Komplex lagen als Immunpräzipitat an Sepharosebeads vor und wurden entweder auf einen Blot (PVDF-Membran) gegeben, der aus einem 2D-Gel mit EL-4-Zelllysat erzeugt worden war, oder auf eine Membran, auf der mittels Spotsynthese (siehe 2.1.2.1) Kinasesubstrat-Peptidsequenzen synthetisiert vorlagen. Es wurde Immunpräzipitat aus 10ml Sepharosebeadsuspension (siehe dazu 2.6.1) erzeugt, um die etwa 18cm x 18cm große Blotmembran zu bedecken. Es wurde Lysat von mit *IL-1* stimulierten EL-4-Zellen in 2D-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet (siehe 2.7.2 bis 2.7.5). Die Blots

wurden 20min in 0,9% NaCl gewaschen, wobei die Lösung nach 10min gewechselt wurde, und getrocknet. Dann wurde je 1µl einer 1mg/ml Histon1-Lösung als Kinasesubstrat an den unteren Rand der Blots pipettiert (siehe auch 2.2.3). Nachdem sie mit Methanol hydrophilisiert worden waren, wurden sie für 5min in 50mM Tris/HCl pH 8 gegeben, bevor sie für 50min in die Denaturierlösung (6M Guanidin-Hydrochlorid, 2mM EDTA, 20mM DTT in 50mM Tris pH 8) überführt und anschließend über Nacht bei 4°C in 10mM Tris/HCl mit 140mM NaCl, pH 7,4 mit 2mM DTT, 2mM EDTA, 0,04% Tween 20 und 1%BSA inkubiert wurden. Peptidmembranen mit Kinasesubstraten (siehe 2.1.2.1, Sequenzen siehe unten) wurden mit Ethanol benetzt und über Nacht bei 4°C in 20mM HEPES pH 7 mit 4% BSA und 1% Tween 20 gegeben. In der gleichen Blockierlösung wurden schließlich die Blots 1h bei Raumtemperatur geschwenkt.

Die Peptidmembranen und die Blots wurden gemeinsam für 45min in Kinasepuffer (20mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,5) gewaschen, wobei der Puffer alle 15min gewechselt wurde, und anschließend 1h darin äquilibriert.

Für den Kinaseassay wurde ein Blot zusammen mit Peptidmembranen in 50ml Kinasepuffer mit dem Immunopräzipitat aus den 10ml Sepharosebeadsuspension gegeben. Eine Peptidmembran wurde zusammen mit einem Blot in 50ml Kinasepuffer ohne Immunopräzipitat inkubiert. Zum Reaktionsstart wurden jeweils 125µCi  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP zugegeben und mit nicht radioaktivem ATP zu 0,5µM ATP-Assaykonzentration ergänzt. Die Assays wurden auf einem Gelschwenker inkubiert. Die Peptidmembranen wurden nach 30min herausgenommen, die Blots nach 60min. Beide wurden mehrfach für etwa je 30min in Kinasepuffer gewaschen, dann mit PBS-Puffer (0,1M Natriumphosphat und 0,15M NaCl, pH 7,2), worin sie schließlich über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Mit dem Handszintillationszähler wurde verfolgt, wie die Radioaktivität auf den Membranen und dem Blot nachließ. Nach 45min Waschen in 5% TCA, 1% Natriumpyrophosphat wurden die Membranen schließlich getrocknet und auf Phosphoscreens exponiert.

**Sequenzen der Peptidspots der Kinasesubstratmembranen**

Spot-Nr.:	Sequenz:	Anmerkung:
1	LRRRRFS	PKG (W. Tegge)
2	TQAKRKKSLAMA	PKG (W. Tegge)
3	RAERRASI	PKA
4	FKKSFKL	PKC
5	RRRKGSFRRKAPKC	optimierte Sequenz
6	EEEEEEEEY	PK (W. Tegge)
7	ENAEYLRVA	EGFK - Autophosphoryl., natürlich
8	EEEEYFELV	EGFK - Autophosphoryl., opt. Sequenz
9	AEEYFFLF	FGF, opt. Sequenz
10	EPDYGALYE	Phospholipase C-gamma (EGFR, PDGFR)
11	EDQYSLVE	PI-3-Kinase (c-Src)
12	VALYDYESR	autophosphoryl. (c-Src)
13	YIYGSFK	src-Familie
14	EFPIYDFLPA	Blk
15	EEEIYGEFEA	c-Src, opt. Sequenz
16	AEVIYAAPFA	c-Abl, opt. Sequenz

Die Anmerkungen geben wieder, von welcher Quelle die Sequenzen stammen bzw. für welche Kinasen sie geeignet sind (nach W. Tegge, Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung der GBF). Die ersten 5 Sequenzen sind spezifisch für Serin/Threonin-, die weiteren für Tyrosinkinase. Die Immobilisierung der Peptide erfolgte auf der rechten Seite der Sequenz. Die Spots sind in vier Reihen mit je vier Spots angeordnet (siehe Abb. 3.15 und 3.16). Die Nummern sind den Spots reihenweise von oben links nach unten rechts zugeordnet. Die Buchstaben stehen nach dem international üblichen Code für einzelne Aminosäuren (siehe 5.1).

### **2.8.2 Färben von Kinasesubstratpeptiden auf Membranen mit FIF und INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP**

Zwei der Peptidmembranen mit Kinasesubstratsequenzen, welche mit IL-1RI-Immunopräzipitat phosphoryliert worden waren, und eine, die parallel dazu einem Assay ohne Kinasen unterzogen worden war, wurden mit FIF gefärbt. Als weiterer Vergleich neben der radioaktiven Markierung wurde eine Peptidmembran (mit Immunopräzipitat phosphoryliert, siehe 2.8.1) mit INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP (nach Pierce-Vorschrift) gefärbt.

Die Membranprobe für die Färbung mit dem Pierce-Produkt wurde mit EDC/Ethylendiamin vorbehandelt (siehe 2.2.5 und 2.1.2.2).

Die Membran für die Färbung mit INDIA™-Phosphoprobe-HRP wurde für 1h in 50mM MES pH 6,0 mit 1M NaCl, 0,05% Tween 20 und 0,125% INDIA™-Phosphoprobe-HRP-Lösung gegeben. Anschließend wurde sie noch 20min in 50mM MES pH 6,0 mit 1M NaCl gewaschen, wobei nach je 5min der Puffer vor Durchführung der Farbreaktion erneuert wurde. Dafür wurde die Membran in eine Lösung aus 10mM Tris mit 200mM NaCl pH 7,5 mit 0,5% Diaminobenzidin-Lösung (5% in Dimethylformamid), 1% NiCl<sub>2</sub>-Lösung (10% in MilliQ-Wasser) und 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (30%ig) gegeben, bis die gewünschte Farbstärke erreicht war. Anschließend wurde sie mit 1% NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet. Zur Dokumentation wurde eine Aufnahme mit der CCD-Kamera gemacht (siehe 2.2.1).

Die Membranen wurden für die Färbung mit FIF über Nacht in 0,05% einer FIF-Lösung (0,2mg/ml DMSO) in 50mM MES pH 6,0 mit 1M NaCl gefärbt, dann 3 x 10min im gleichen MES-Puffer ohne FIF nachgewaschen und schließlich die Fluoreszenz detektiert (siehe 2.2.1).

## 2.9 Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen

Bei der Chromatographie mit Eisen(III)-IDA wurde beobachtet, daß neben Phosphatresten an Proteinen auch Carboxylgruppen, insbesondere in Verbindung mit Phenolresten, gut gebunden werden (Muszynska-G et al. 1992). Von dieser Idee ausgehend wurden zwei Peptidmembranen (siehe 2.1.2.1) erstellt, in denen fast durchgehend Tyrosin, Serin oder Threonin eingesetzt waren. Auf einer Membran waren diese phosphoryliert, auf der anderen nicht. Die Listen der Peptide sind in Abb. 5.1 beigelegt. Klein geschriebene Buchstaben stehen dabei für die Phosphoderivate der Aminosäuren. Die Membranen wurden freundlicherweise von Dr. Ronald Frank und seinen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung der GBF zur Verfügung gestellt.

Die Membranen wurden zunächst mit Ethanol benetzt, bevor sie in 50mM MES mit 1M NaCl, pH 6 äquilibriert wurden. Vor der Färbung wurde die Fluoreszenz detektiert und anschließend über Nacht in dem MES-Puffer unter Zusatz von 0,05% FIF-Lösung (0,2mg/ml in DMSO) bei 20°C gefärbt. Danach wurden sie dreimal mit dem MES-Puffer nachgewaschen und erneut die Fluoreszenz detektiert (siehe 2.2.1).

Um abschätzen zu können, ob der Fluorescein-Anteil des FIF für unspezifische Bindungen verantwortlich ist und um die Wirksamkeit einer Entfärbung beurteilen zu können, wurden die Membranen mit 0,5M Natriumphosphatpuffer pH 8 1h entfärbt, mehrfach mit deionisiertem Wasser



nachgewaschen und nach 10min erneuten Äquilibrierens im MES-Puffer die Fluoreszenz detektiert. Anschließend wurden sie mit 0,05% Fluorescein-Lösung (0,1mg/ml in DMSO) im MES-Puffer über Nacht gefärbt, dann dreimal mit MES-Puffer nachgewaschen; schließlich wurde erneut die Fluoreszenz detektiert.

### ***Auswertung der Bilder per Software***

Die Auswertung der Helligkeitswerte, die der Fluoreszenzintensität der Peptide entsprachen, wurde mit einer Software für Spotmembranen (Phoretix Array Advanced Version 1.00, 1998, NonLinear Dynamics Ltd.) durchgeführt. Dabei wurden die Helligkeitswerte einer kreisförmigen Fläche, die die Peptidspots etwas überragte, vermessen. Als abzuziehender Hintergrundwert wurde die auf die Fläche umgerechnete Begrenzungslinie verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Entwicklung einer Färbemethode für Membranen

##### 3.1.1 Membranmaterial (siehe 2.2.6 und 4.2.2)

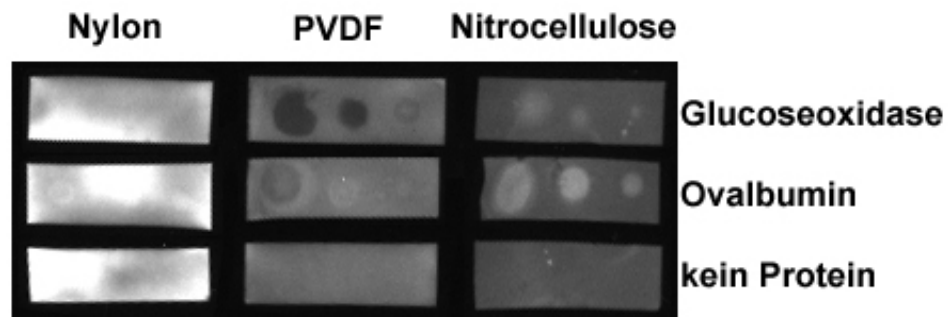


Abb. 3.1: Membranmaterial

Abb. 3.1 zeigt von links nach rechts Nylon-, PVDF- und Nitrocellulose-Membranstücke. Die unterste Probe ist ohne Protein, die mittlere mit Ovalbumin und die obere mit Glucoseoxidase bespottet, jeweils von links nach rechts mit 10, 2,5 und 0,5µg.

Auf der Nylonmembran sind unter den Versuchsbedingungen Ovalbumin und Glucoseoxidase nach der Färbung kaum vom hohen, ungleichmäßigen Hintergrund zu unterscheiden. Lediglich der 10µg Ovalbumin-Spot ist schwach zu erkennen.

Die Hintergrundfärbung der PVDF-Membran ist stärker als die der Nitrocellulose. Ovalbumin wird hier schwach und Glucoseoxidase so gut wie nicht gefärbt, so daß sogar eine Art Negativfärbung zu sehen ist. Das Verhältnis von Hintergrund zu gefärbtem Protein ist also insgesamt ungünstig (siehe auch 3.1.3). Nitrocellulose wird auch angefärbt, aber wie die Abbildung zeigt, fluoreszieren die gefärbten Proteine klar stärker. Ovalbumin wird dabei deutlich besser markiert als Glucoseoxidase.

## 3.1.2 Temperaturabhängigkeit

(siehe 2.2.7 und 4.2.3)

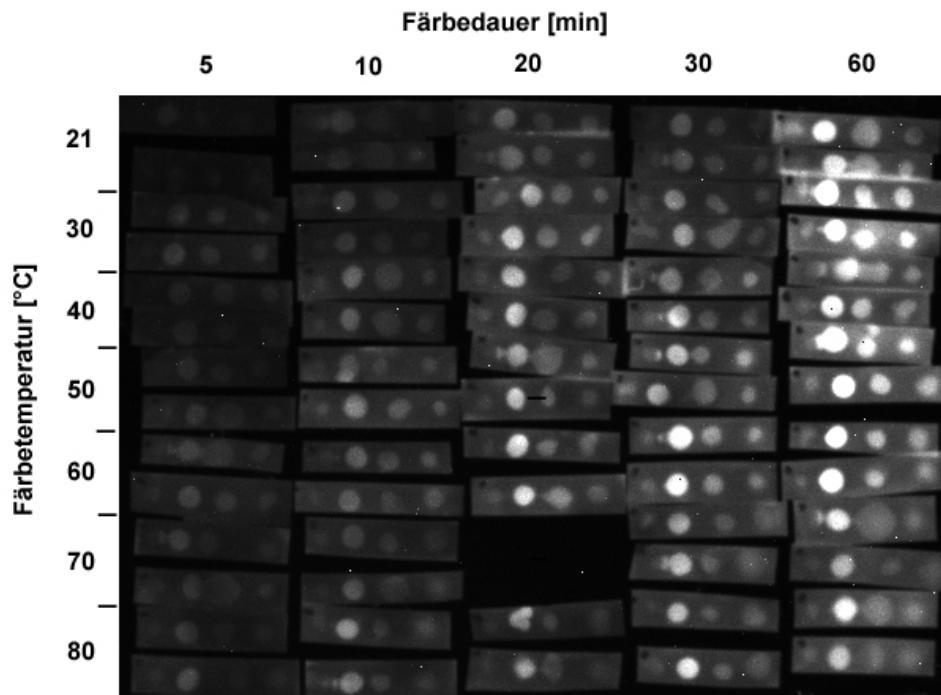


Abb. 3.2 A: Temperaturabhängigkeit

Abb. 3.2 A zeigt von links nach rechts die Ergebnisse der Färbungen über einen Zeitraum von 5, 10, 20, 30 und 60 min. Von oben nach unten gehören je zwei Probestreifen zu den Färbetemperaturen 21, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C. Die Proteinspots entsprechen von links nach rechts jeweils Phosvitin, Ovalbumin, Lysozym und Glucoseoxidase.

Es ist deutlich zu erkennen, daß Ovalbumin am intensivsten gefärbt wird. Bereits nach 10min ist es klar auf allen Proben ab 40°C zu sehen. Zwischen 20 und 30min ist kein erheblicher Unterschied in den Intensitäten erkennbar. Nach 60min ist Ovalbumin bei allen Temperaturen gut gefärbt, und bis 60°C sind auch Lysozym und Glucoseoxidase deutlich zu sehen. Bei 70 und 80°C läßt die Intensität der Fluoreszenz im Gegensatz zu den niedrigeren Temperaturen durchschnittlich etwas nach. Die Betrachtung der Helligkeitswerte in Kurven, bei denen die Helligkeitswerte der verschiedenen Proteine bei einer jeweils angegebenen Temperatur gegen die Zeit dargestellt sind (Abb. 3.2 B), bestätigt den optischen Eindruck und zeigt ebenfalls, daß Phosvitin am wenigsten intensiv gefärbt wird. Ab 60°C ist die Differenz der Intensität zwischen dem Phosphoprotein Ovalbumin und den anderen Proteinen größer als bei den niedrigeren Temperaturen.

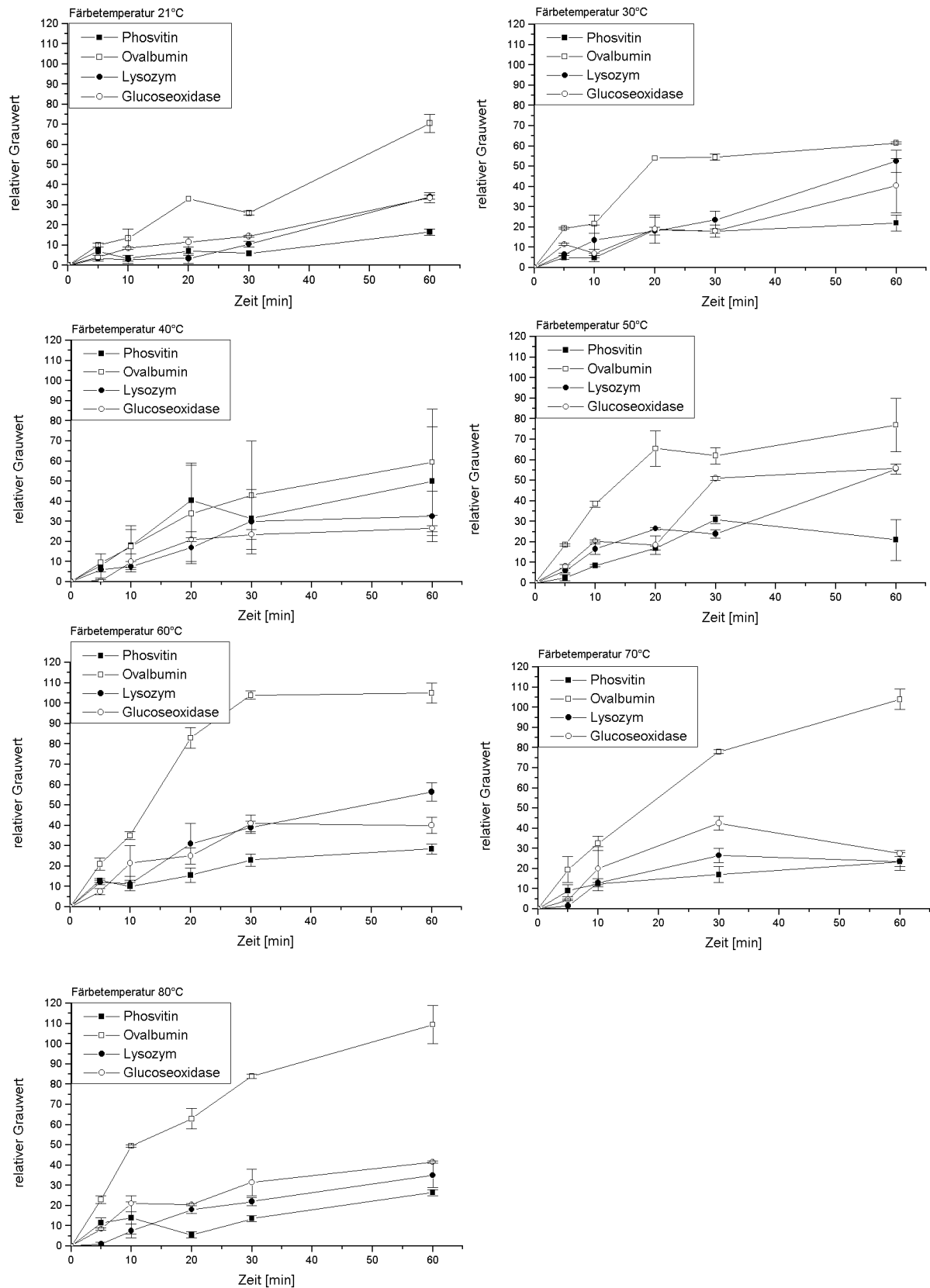


Abb. 3.2B: Temperaturabhängigkeit

## 3.1.3 Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin und BSA

(siehe 2.2.8 und 4.2.4)

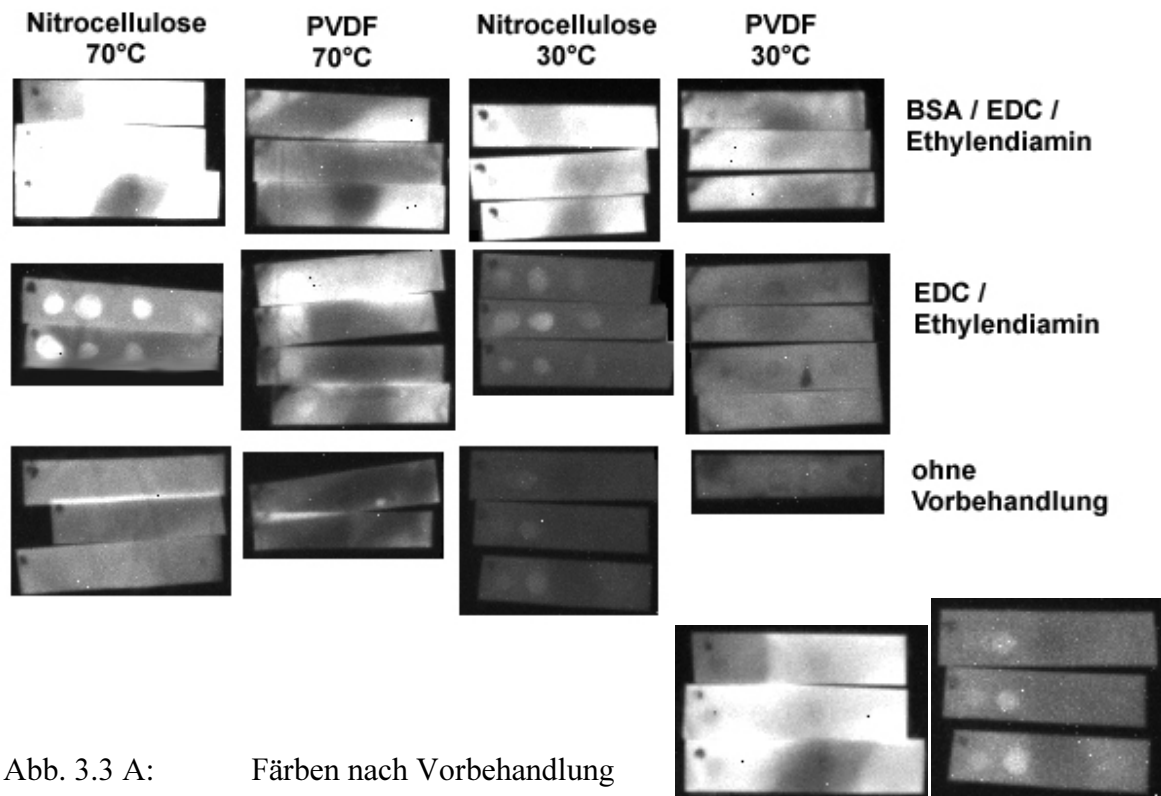


Abb. 3.3 A: Färben nach Vorbehandlung

Abb. 3.3 B

Abb. 3.3 C

Abb. 3.3 A zeigt die Fluoreszenz verschieden behandelter Membranen nach der Färbung mit FIF. Die erste und die dritte Spalte zeigen Nitrocellulose, die zweite und vierte PVDF. Die Membranstücke der ersten beiden Spalten sind bei 70°C, die der dritten und vierten bei 30°C gefärbt. Die oberen drei Proben sind mit EDC/Ethylendiamin und BSA vorbehandelt, die nächsten nur mit EDC/Ethylendiamin und die unteren gar nicht. Aufgetragen sind auf PVDF Casein, Ovalbumin und Glucoseoxidase mit jeweils 0,5µg, bei Nitrocellulose zusätzlich Lysozym.

Die Abbildung zeigt, daß, nach Blocken der Membran mit BSA und anschließender Behandlung mit EDC/Ethylendiamin vor der Färbung, ein ungleichmäßiger, hoher Hintergrund resultiert. So ist lediglich nach kurzer Expositionszeit (30 statt 60 Sekunden) der Probe (siehe Abb. 3.3B) ein schwächer gefärbter ("Negativspot") Caseinspot zu sehen, der bei längerer Exposition überstrahlt wird. Die EDC/Ethylendiamin-Behandlung ohne BSA-Behandlung vor einer Färbung bringt dagegen eine intensivere Fluoreszenz der gefärbten Proteine. Casein ist dann sehr gut zu sehen, bei 70°C intensiver, bei 30°C etwas weniger intensiv fluoreszierend als Ovalbumin. Ohne Vorbehandlung lassen sich bei der 70°C-Färbung keine Proteinspots, bei 30°C nur Ovalbumin und Casein erkennen, letzteres nur schwach und nach längerer Expositionszeit (120 Sekunden, siehe Abb. 3.3C). Insgesamt ist der

Hintergrund bei den 70°C-Proben höher als bei den bei 30°C gefärbten.

Bei den PVDF-Proben lassen sich lediglich die Caseinspots der 70°C-Färbung nach EDC/Ethylendiamin-Behandlung undeutlich erkennen.

### 3.1.4 pH-Wert-Einfluß

(siehe 2.2.9 und 4.2.5)

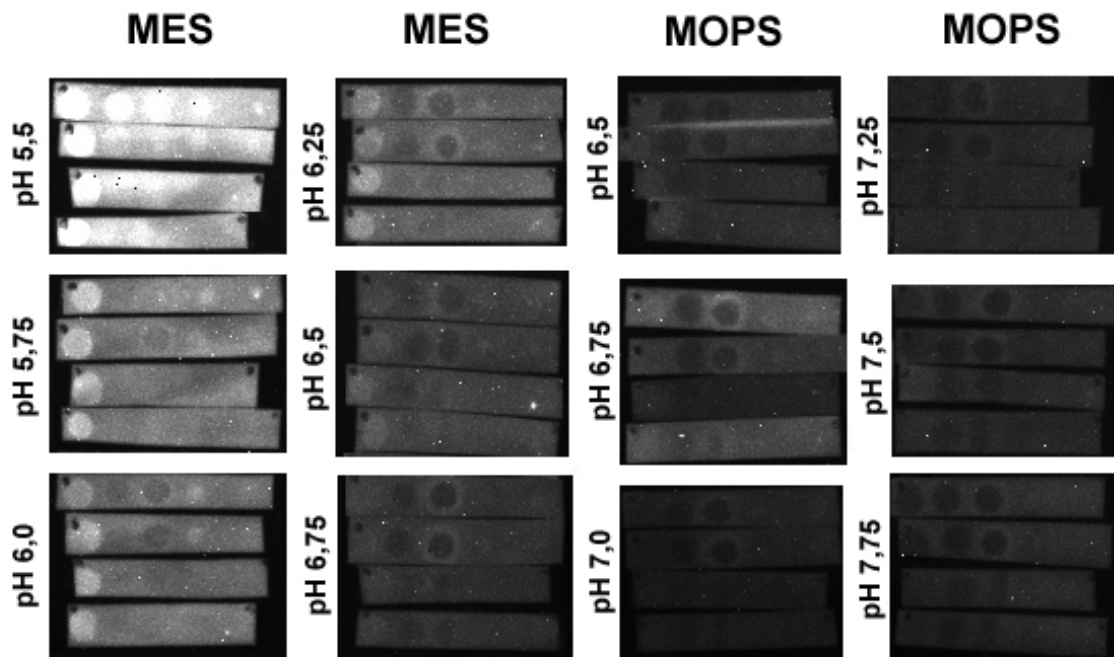


Abb. 3.4: Färben bei verschiedenen pH-Werten

Abb. 3.4 zeigt Nitrocellulosestreifen mit Ovalbumin, Casein, Glucoseoxidase, Phosvitin und Lysozym, die bei 80°C gefärbt wurden. Je vier Membranstreifen sind bei einem pH-Wert eines der unten angegebenen Puffer gefärbt worden. Die pH-Werte waren Reihe für Reihe von oben nach unten aufsteigend wie folgt:

MES pH 5,5 / 5,75 / 6 / 6,25 / 6,5 / 6,75

MOPS pH 6,5 / 6,75 / 7 / 7,25 / 7,5 / 7,75

Die jeweils oberen zwei der vier Proben zu den pH-Werten sind mit 2,5µg je Protein bespottet, die beiden anderen mit 1µg je Protein.

Ovalbumin ist von pH 5,5 bis pH 6,5 mit abnehmender Intensität vor dem Hintergrund zu erkennen, dessen Fluoreszenzintensität ebenfalls abnimmt. Casein, Glucoseoxidase, Phosvitin und Lysozym sind bei pH 5,5 zu sehen. Ab pH 6 deutet sich an, daß Glucoseoxidase und Casein weniger intensiv fluoreszieren als die Membran; dies gilt bis pH 7,75. Phosvitin läßt sich bis pH 6 noch schwach

erkennen, dann nicht mehr, auch nicht als "Negativspot". Lysozym ist aufgrund der Aufbringungsprobleme (siehe 2.2.9) nicht auswertbar.

### 3.1.5 Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration (siehe 2.2.10 und 4.2.6)

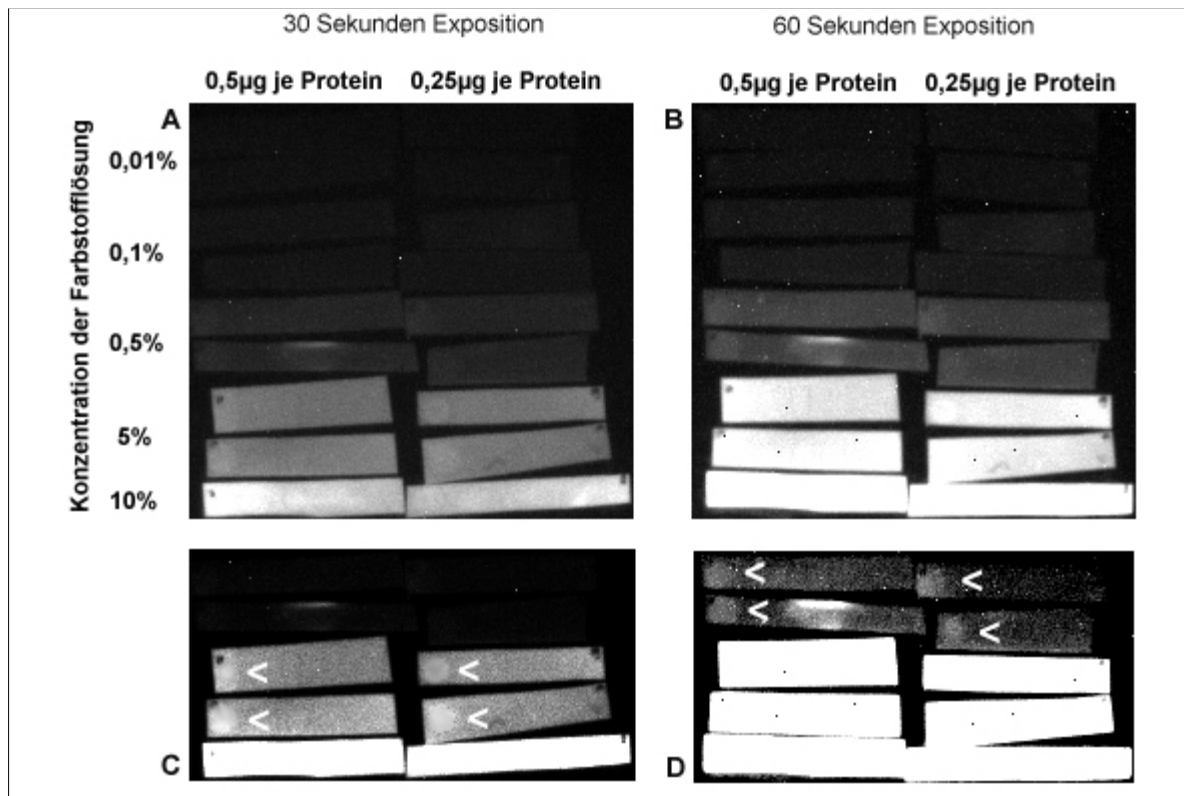


Abb. 3.5: Färben mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen

Abb. 3.5 zeigt Nitrocellulosemembranstücke, die mit Ovalbumin, Casein, Glucoseoxidase, Phosvitin und Lysozym bespottet sind. Die linke Spalte zeigt die Proben, bei denen jeweils 0,5µg, die rechte diejenigen, bei denen je 0,25µg Protein aufgetragen wurde. Abb. 3.5 A wurde 30 Sekunden, B 60 Sekunden exponiert. C zeigt den unteren Ausschnitt von A stärker kontrastiert, um die mit weißen Pfeilen markierten Spots hervorzuheben. D ist der entsprechende Ausschnitt von B. Von oben nach unten gehören je Spalte zwei Streifen zu folgenden Konzentrationen der FIF-Lösung bei der Färbung:

0,01 % / 0,1 % / 0,5 % / 5 % / 10 %

Von den 10%-Proben ist nur je ein Streifen vorhanden.

Ovalbumin ist als einziges Protein als Fluoreszenzspot überhaupt zu erkennen (siehe Pfeile in Abb. 3.5 C und D). Bei welcher Farbstoffkonzentration das der Fall ist, hängt von der Expositionszeit ab. Nach

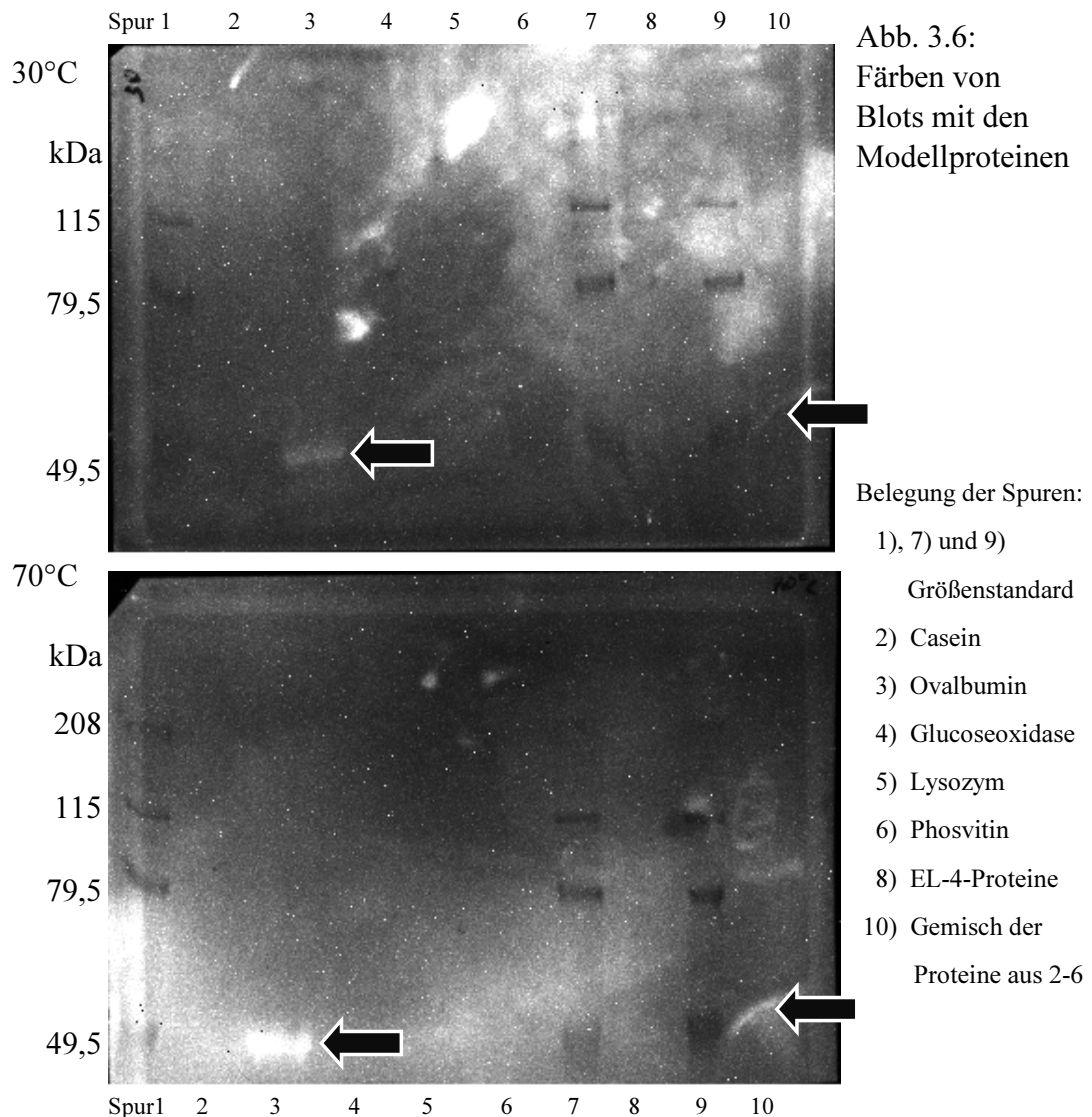
30 Sekunden kann man es bei einer Konzentration von 5%, nach 60 Sekunden von 0,5% sehen. Bei den jeweils höheren Konzentrationen überstrahlt der Hintergrund die Spots.

Der Hintergrund nimmt mit dem Farbstoffanteil deutlich zu. Während die 5%-Proben bereits ein Helligkeitsmaximum erreichen, sind die 0,01- und 0,1%-Proben kaum zu erkennen.

### 3.1.6 Färben von Blots mit den Modellproteinen

(siehe 2.2.11 und 4.2.7)

Abb. 3.6 zeigt die bei 30°C (oben) und 70°C (unten) mit FIF gefärbten Blots mit Ovalbumin, Casein, Lysozym und Phosvitin. Die Ovalbumin-Bande (43kDa) ist in der dritten Spur klar und in der letzten, mit dem Gemisch der Proteine aus den Spuren 2-6, etwas verzogen zu erkennen (siehe Pfeile). Casein (Spur 2), Lysozym (Spur 5) und Phosvitin (Spur 6) mit 34, 21 und 10kDa sind nicht zu sehen, da sie





vermutlich bereits aus dem Gel gelaufen waren. Glucoseoxidase (63kDa) in Spur 4 und 10 ist nicht zu sehen. Die Färbung bei 70°C ist intensiver. Die EL-4-Proteinprobe in Spur 8 ist nicht gefärbt worden. Die Größenstandards in den Spuren 1, 7 und 9 sind als dunkle Banden zu erkennen. Insgesamt sind viele unspezifisch fluoreszierende Bereiche zu sehen, die Färbung ist unsauber.

### 3.2 Kapillarelektrophorese

(siehe 2.3 und 4.2.8)

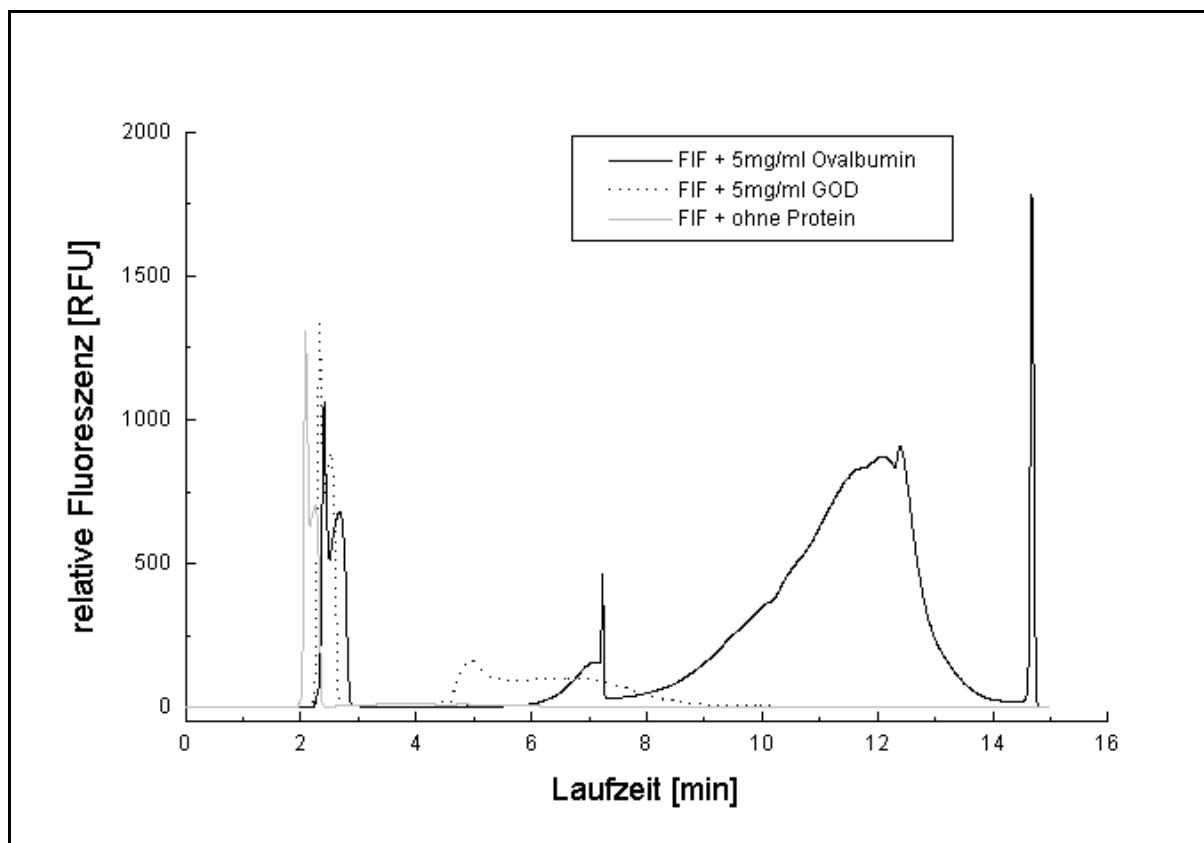


Abb. 3.7: Markieren von Ovalbumin und Glucoseoxidase (GOD) mit FIF in der CE

Abb. 3.7 zeigt die Fluoreszenzintensität während der CE-Läufe in relativen Fluoreszenz-Einheiten über die Zeit. Die drei übereinandergelegten Kurven zeigen zum einen nur FIF (fein gepunktete Kurve), das etwa nach zwei Minuten ein Maximum erreicht, gefolgt von einem kleineren Maximum. Zum anderen wird FIF mit Glucoseoxidase gezeigt (grob gepunktete Linie) und zuletzt mit Ovalbumin (durchgezogene Linie). Die beiden Kurven mit den Proteinproben weisen ebenfalls die FIF-Maxima auf (die

Verzögerung von 10-20sec und ebenso die Verringerung der Peakhöhe bei Ovalbumin liegen im Fehlerbereich und sind keine Folge der Proteinzugabe). BSA erzeugt darüber hinaus bei etwa 5min ein deutlich niedrigeres Maximum, das sich nach hinten über etwa 3min ausstreckt. Die Ovalbuminkurve ist etwas komplexer. Hier ist nach 7min ein leichtes Fluoreszenzmaximum, etwa in der Größe des Glucoseoxidase-Maximums, zu verzeichnen, das 10sec später in einem etwa dreimal höheren Peak endet. Es schließt sich eine langsame Steigung über 4min an, die bei etwa 12min ein Maximum mit knapp der doppelten Höhe des vorangegangenen und damit fast der des höheren FIF-Peaks erreicht. Nach 14min erreicht die Kurve fast die Grundlinie, bevor sie etwa 40sec später in einem scharfen Peak endet, der etwa 1,5 mal so groß ist wie der höhere FIF-Peak.

### 3.3 Produktion von Interleukin-1 mit dem E.coli-Stamm CAG pIL-1 $\beta$ 3

(siehe 2.4)

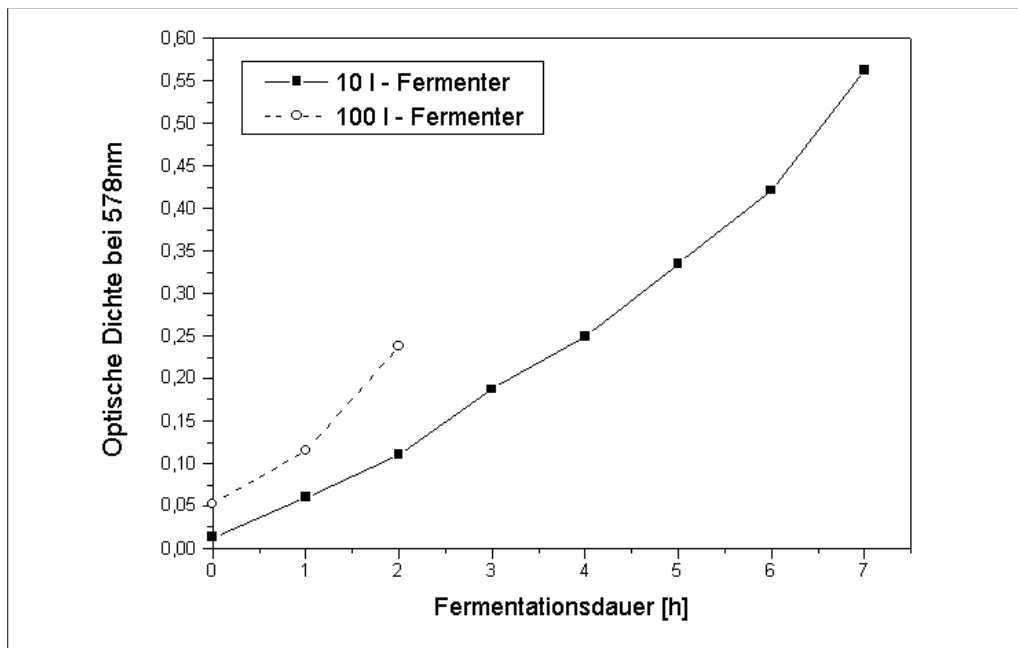


Abb. 3.8: Wachstumskurven der E.coli-Kultur während der Fermentation

Die Produktion von IL-1 mit dem E.coli-Stamm CAG pIL-1 $\beta$ 3 war erfolgreich. Im Vorversuch (nicht gezeigt) gelang die Produktion bereits im 1l-Maßstab mit verschiedenen Medien. Das preisgünstige und effektive Medium aus 1 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl mit 0,01% Ampicillin wurde

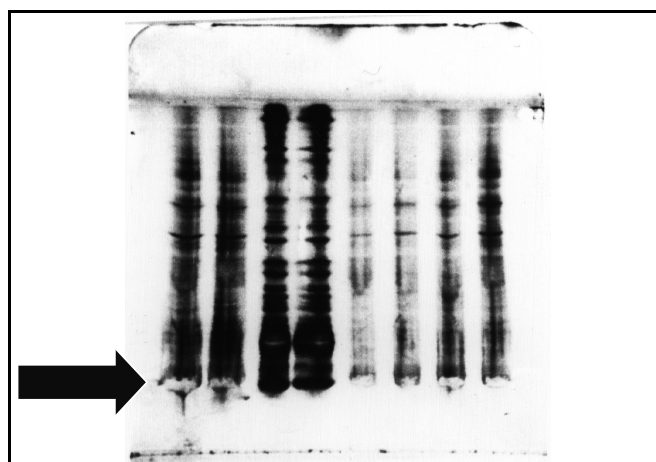


Abb. 3.9: Kontrollgel der E.coli-Kultur mit verschiedenen Lysatverdünnungen

danach ausgewählt. Die Übertragung auf den 100l-Maßstab gelang dann ebenfalls ohne Probleme. Wie an den Kurven ersichtlich, wuchsen die Zellen den Erwartungen entsprechend. Abb. 3.8 zeigt die Wachstumskurven der Fermentationen. Nach 7h Inkubation im 10l - Fermenter war die optische Dichte bei 578nm von 0,025 auf etwa 0,55 angestiegen, der Inhalt wurde in den 100l - Fermenter gegeben und weiter kultiviert. Durch die Verdünnung ergab sich eine  $OD_{578}$  von etwa 0,055. Das Wachstum wurde dann nur noch zwei Stunden bis zu einem Wert von knapp 0,25 verfolgt. Im Phastgel (Abb. 3.9) zeigten sich in den aufgeschlossenen Proben der geernteten E.coli-Kultur die erwarteten IL-1-Banden (siehe Pfeil). Die weiteren Experimente, bei denen das produzierte IL-1 eingesetzt wurde, bestätigten schließlich noch dessen Funktionalität (siehe 3.4.1, 3.5 und 3.6).

### 3.4 Immunopräzipitation und Kinaseassays

#### 3.4.1 Optimieren der Antikörpermenge für die Immunopräzipitation (siehe 2.6.2)

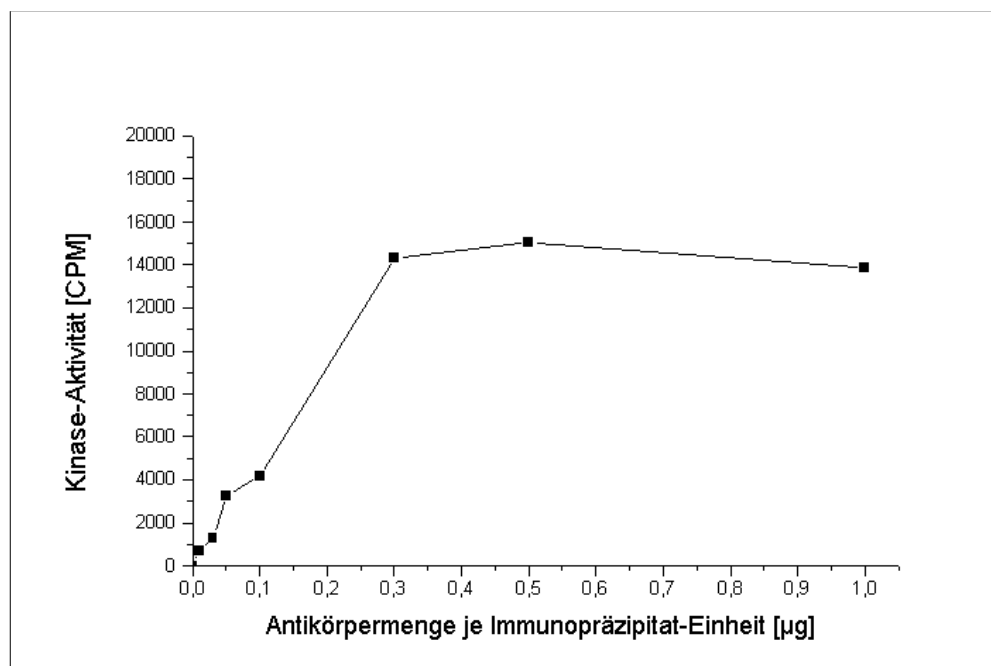


Abb. 3.10: Optimieren der Antikörpermenge für die Immunopräzipitation

Abb. 3.10 zeigt den Verlauf der Kinaseaktivität von Immunopräzipitat mit der Zunahme der IL-1RI-Antikörpermenge anhand der gemessenen Radioaktivität nach einem Kinaseassay mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Die Kurve steigt bis 0,3 µg Antikörper je  $10^7$  Zellen an und bleibt dann auf etwa gleichem Niveau. Für alle folgenden Experimente wurde deshalb dieses Mengenverhältnis verwendet.

### 3.4.2 Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel (siehe 2.6.3 und 4.2.9)

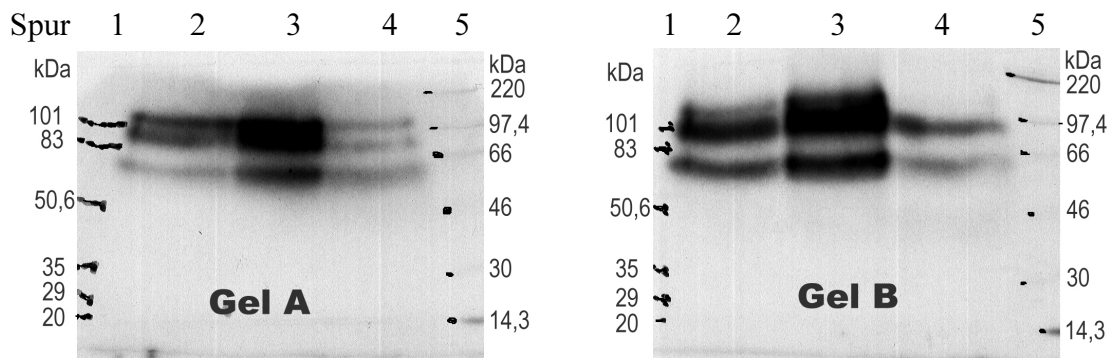


Abb. 3.11: Regenerierung von Kinaseaktivität

Abb. 3.11 zeigt die Radioaktivität von zwei Gelen mit IL-1RI-Immunopräzipitat, mit denen nach einer Regenerierungsbehandlung ein Kinaseassay mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt wurde. Die erste Spur der beiden Gele stellt jeweils einen per Hand nachgezeichneten Protein-Größenmarker dar. Die zweite Spur zeigt das IL-1RI-Immunopräzipitat von nicht stimulierten EL-4-Zellen, das im SDS-Probenpuffer 5min gekocht wurde. Die dritte Spur zeigt die entsprechende Probe von stimulierten EL-4-Zellen, die vierte entspricht der dritten mit dem Unterschied, daß die Probe nicht gekocht wurde. Die letzte Spur zeigt einen radioaktiven Protein-Größenmarker (per Hand mit Punkten nachmarkiert, um schwache Banden anzuzeigen). Gel A ist das durch Histon 1 und Myelin Basic Protein ergänzte Substratgel, Gel B enthält diese Zusätze nicht.

Die Proben weisen, bis auf die letzte in Gel B, bei der nur zwei Banden zu sehen sind, alle drei klar unterscheidbare radioaktive Banden auf, die Proteinmassen in einer Größenordnung von etwa 120, 90 und 60kDa entsprechen. In der Probe mit nur zwei Banden fehlt die 120kDa-Bande.

Es ist deutlich zu sehen, daß die radioaktive Markierung bei den stimulierten, gekochten IL-1RI-Komplexproben am stärksten ist, gefolgt von den nicht stimulierten und von den nicht gekochten stimulierten. Die Banden in Gel B sind bei gleicher Hintergrundfärbung insgesamt etwas dunkler als die in Gel A.

Die Banden der stimulierten, gekochten Rezeptorkomplexproben erscheinen in Gel A alle etwa gleich geschwärzt. In Gel B ist nicht klar erkennbar, ob die Bande des größten markierten Proteins nicht etwas schwächer ist, da die benachbarte Bande diese z.T. überstrahlt.

Die nicht stimulierte Probe weist in Gel A die beiden größeren Proteine etwa gleich stark radioaktiv auf, die 60kDa-Bande ist etwas schwächer. In Gel B dagegen entsprechen sich die Banden der beiden kleineren Proteine in der Schwärzung etwa, die des größten ist deutlich heller.

In Gel A sind die drei Banden der stimulierten, nicht gekochten Probe etwa gleich stark markiert, in Gel B erscheint die 90kDa-Bande leicht stärker als die bei 60kDa.

### 3.5 Erstellen und Färben von 2D-Gelen und -Blots (siehe 2.7 und 4.2.10)

Die Blotausschnitte in den Abbildungen 3.12 bis 3.13 zeigen von oben nach unten kleinere Proteine (Bereich um 40-70kD) und von links nach rechts nimmt der pI-Wert (Bereich um pI 4-6) zu.

Abbildung 3.12 zeigt jeweils denselben Ausschnitt eines Blots von einem 2D-Gel aus Gesamtlysat von nicht stimulierten EL-4-Zellen. Dabei ist (A) mit FIF gefärbt und bei pH 6,0 detektiert und (B) mit indischer Tinte gefärbt und mit einem PC-Scanner gescannt. In (C) ist die Fluoreszenzdetektion bei pH 9,0 gezeigt. (D) stellt die Färbung mit indischer Tinte derselben Membran, aufgenommen mit der CCD-Kamera für die Fluoreszenzdetektion, bei normaler Raumbeleuchtung dar.

Abbildung 3.13 zeigt fast den gleichen Ausschnitt wie 3.12, allerdings von mit IL-1 stimulierten EL-4-Zellen. In (A) ist die Fluoreszenz zu sehen, die bei pH 9 detektiert wurde, und in (B) die mit dem PC-Scanner gescannte Färbung mit indischer Tinte.

Die kleinen Pfeile in Abb. 3.12 und 3.13 zeigen exemplarisch einzelne Spots, die entweder bei der Färbung mit indischer Tinte deutlich zu sehen sind, bei der Färbung mit FIF dagegen weniger deutlich bzw. umgekehrt, oder die, die unter den verschiedenen Detektionsbedingungen unterschiedlich gut zu sehen sind. Die großen Pfeile sind Orientierungshilfen. Sie zeigen einen Spot, der sowohl in Abb. 3.12 (A) bis (D) als auch in Abb. 3.13 (A) und (B) zu sehen ist.

In 6.3 sind die Abbildungen der vollständigen Blots, ein Radioaktivmuster eines entsprechenden Blots und eines Gels gezeigt. Darüber hinaus ist dort ein Gel nach dem Blotten zu sehen, das nachgefärbt worden war (siehe Abb. 6.2 und 6.3).

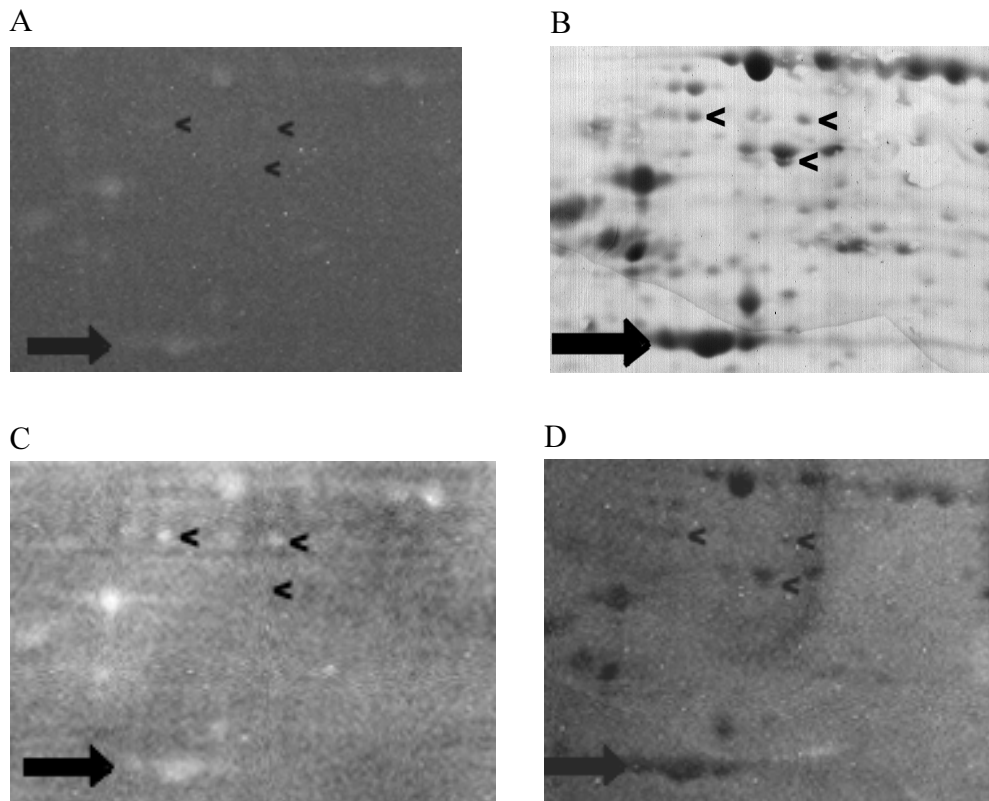


Abb. 3.12: Ausschnitt eines Blots aus einem 2D-Gel von Gesamtlisat von nicht stimulierten EL-4-Zellen nach: (A) FIF-Färbung mit Detektion bei pH 6; (B) Gesamtproteinfärbung gescannt mit PC-Scanner; (C) FIF-Färbung mit Detektion bei pH 9; (D) Gesamtproteinfärbung aufgenommen mit CCD-Kamera

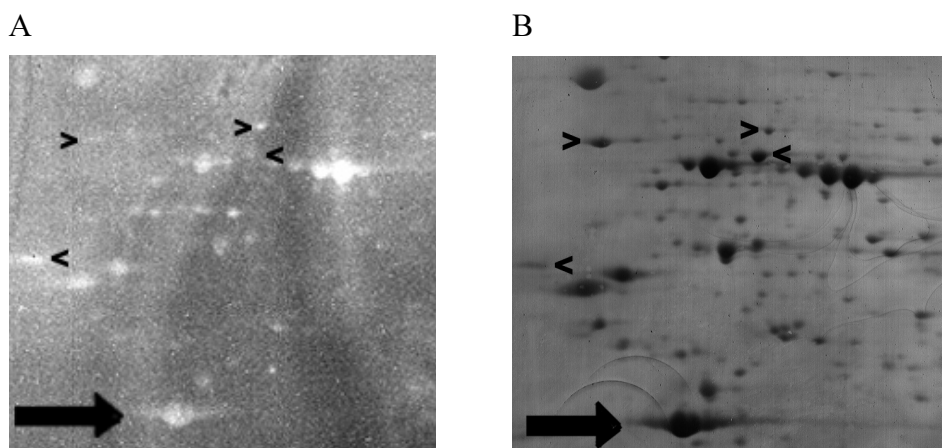


Abb. 3.13: Ausschnitt eines Blots aus einem 2D-Gel von Gesamtlisat von stimulierten EL-4-Zellen nach: (A) FIF-Färbung mit Detektion bei pH 9; (B) Gesamtproteinfärbung gescannt mit PC-Scanner

### 3.6 Färbung von Membranen nach Kinaseassays

#### 3.6.1 Kinaseaktivität von Immunpräzipitat auf Blot- und Peptidmembranen

(siehe 2.8.1 und 4.2.11)

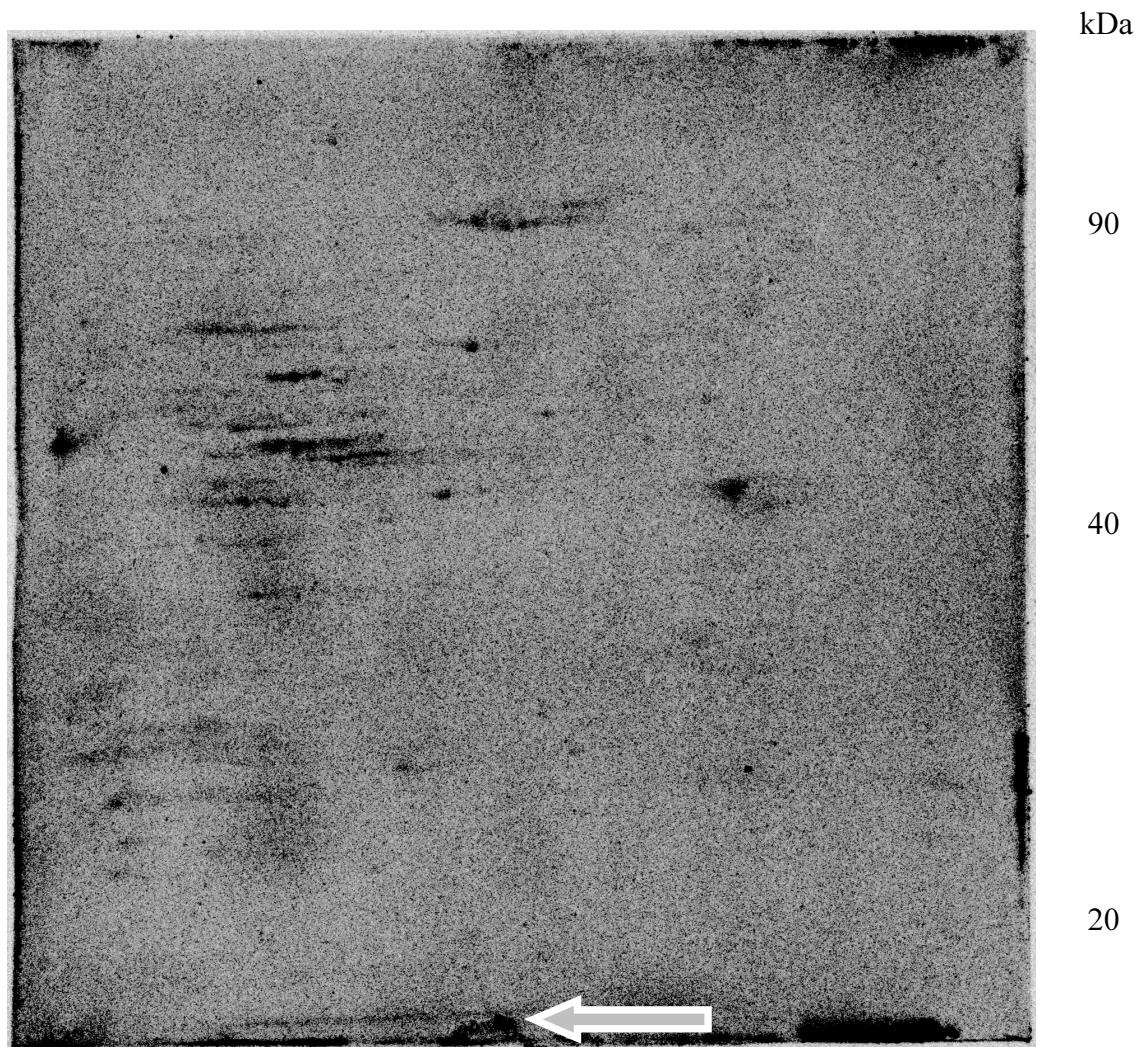


Abb. 3.14 A: Phosphorylierung von geblottetem EL-4-Lysat durch IL-1RI-Immunopräzipitat

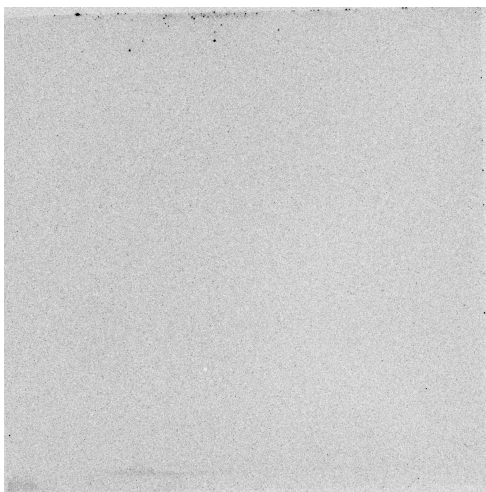


Abb. 3.14 B: Geblottetes EL-4-Lysat nach Kinaseassay ohne Immunopräzipitat



Abbildung 3.14 A und B zeigen die radioaktiven Stellen der beiden Blots der 2D-Gele aus EL-4-Lysat nach dem Kinaseassay (A) mit und (B) ohne IL-1RI-Immunopräzipitat. Das Molekulargewicht nimmt dabei von oben nach unten ab und der pH-Wert von pH 3 auf pH 10 von links nach rechts zu. In Abb. 3.14 B ist nur ein schwacher Hintergrund zu erkennen, der in Abb. 3.14 A deutlich erhöht ist. Darüber hinaus weist Abb. 3.14 A diverse markierte Stellen auf, die z.T. einzelne Proteine bzw. Proteinketten erkennen lassen. Am unteren Rand des Blots ist deutlich der Gelrand (die Bromphenolblaubande) zu sehen und darunter das per Hand aufgebrachte Histon1 (siehe Pfeil).

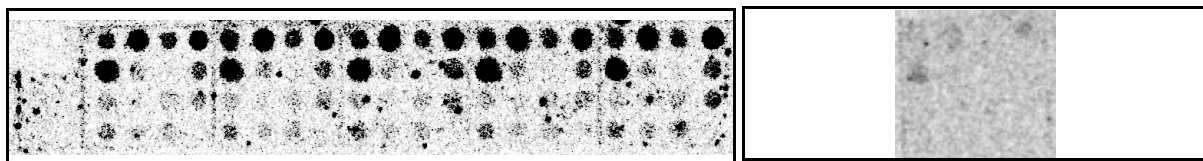


Abb. 3.15 A: Phosphorylierung von Peptidmembranen durch IL-1RI-Immunopräzipitat (IP)

Abb. 3.15 B: Peptidmembran nach Assay ohne IP

Abbildung 3.15 zeigt die Radioaktivität der Peptidmembranen mit Kinasesubstratsequenzen nach einem Kinaseassay mit (Abb. 3.15 A) und ohne (Abb. 3.15 B) IL-1RI-Immunopräzipitat. Die 16 Spots sind von links nach rechts und oben nach unten durchnummeriert. Nummer 2, 4 und 5 weisen auch ohne Zugabe von Kinase eine erkennbare, leichte Radioaktivmarkierung über einem niedrigen Hintergrund auf (Abb. 3.15 B). Durch Kinasezugabe werden diese drei Sequenzen am deutlichsten markiert, gefolgt von Spot 1, 3 und 8. Die Spots 12 und 13 sind bereits schwächer zu sehen, gefolgt von Nummer 6, 9, 11, 14 und 15. Sehr schwach ist die Markierung von Spot 10, nicht vom Hintergrund zu unterscheiden sind die Spots 16 und 7. Die Sequenzen der zu den Spots gehörigen Peptide sind in 2.8.1 angegeben.

### 3.6.2 Färben von Kinasesubstratpeptiden auf Membranen mit FIF und INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP (siehe 2.8.2 und 4.2.12)

Abb. 3.16 zeigt die Peptidmembranen mit Kinasesubstraten nach einem radioaktiven Kinaseassay (A) mit FIF und (B) mit INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP gefärbt (Diaminobenzidin -siehe 2.8.2). Die ersten beiden Membranen (A oben und Mitte) sind durch das IL-1RI-Immunopräzipitat phosphoryliert worden, die dritte (A unten) jedoch nicht. Dennoch ist kein Unterschied in der Färbung zu erkennen.

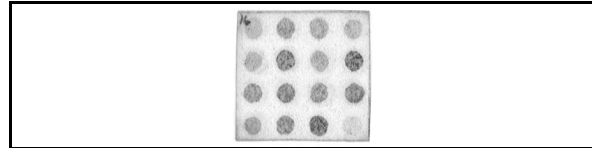
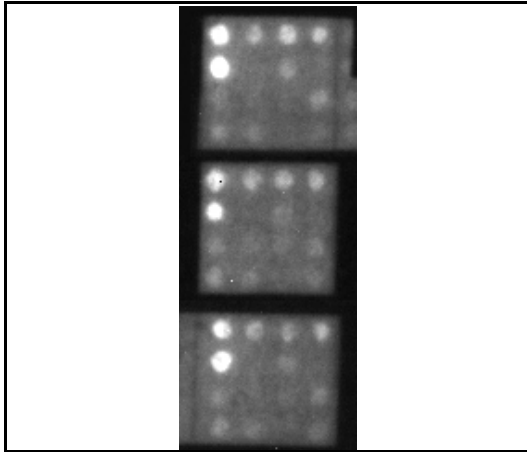


Abb. 3.16 B: Peptidmembran gefärbt mit INDIA™-Phosphoprobe-HRP (TMB-Färbung)

Abb. 3.16 A: Peptidmembranen gefärbt mit FIF

Deutlich fluoreszieren die Spots 1 und 5, weniger intensiv die Spots 2, 3 und 4 und nur noch schwach die Spots 7, 9, 12, 13, 14. Die Nummern 10, 11 und 16 lassen sich kaum, 6, 8 und 15 nicht mehr vom Hintergrund unterscheiden.

Auf Membran B, die einer Phosphorylierung durch das Immunopräzipitat unterzogen worden war, sind alle Spots gefärbt. Eine Korrelation mit der Phosphorylierung ist dabei nicht zu erkennen.

### 3.7 Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen

(siehe 2.9 und 4.2.13)

Alle Abbildungen der Fluoreszenzintensitäten der Peptidmembranen in der Gesamtansicht sind unter 6.2 (Abb. 6.4 bis 6.11), die Liste der Sequenzen der Spots unter 6.3 gezeigt.

Die Abb. 3.17 und 3.18 zeigen die Listen der relativen Fluoreszenzintensitätswerte und Sequenzen der markierten Peptide nach der Färbung mit FIF. Von den mit der Software ermittelten Werten (siehe 2.9) wurden dafür die Werte der Fluoreszenz vor den Färbungen als Hintergrund subtrahiert. Gezeigt sind jeweils die Werte für die Membranen mit und ohne Phosphoaminosäuren. Kleinbuchstaben symbolisieren dabei entweder die Phosphoaminosäure oder die gleiche Aminosäure in dem entsprechenden nicht phosphorylierten Peptid. Ist neben einem Peptid auch die zugehörige Isoform auf der anderen Membran unter den Markierten, so wird sie mit angegeben. Die Listen geben zudem an, wenn ein Peptid auch mit Fluorescein ab Werten von 5000 markiert wurde.

Die Sequenzen der mit FIF markierten Phosphopeptide weisen vor allem Phosphotyrosin auf,

Phosphothreonin und Phosphoserin dagegen nur in wenigen Fällen. Des weiteren wird deutlich, daß viele kleinere, aber auch aromatische Aminosäuren und sehr wenig geladene in den markierten phosphorylierten Peptiden enthalten sind. Die Gesamtladung der Peptide mit geladenen Aminosäuren ist immer positiv.

Unter den nicht phosphorylierten Peptiden finden sich dagegen vor allem solche markiert, die Ladungen tragen. Die Gesamtladung der Peptide ist dabei meist positiv, in keinem Fall negativ. Eine markante Bevorzugung einer phosphorylierbaren Aminosäure ist nicht zu beobachten. Serin, Threonin und Tyrosin treten ebenso wie Peptide ganz ohne eine dieser drei auf.

Die Peptide ohne geladene Aminosäuren besitzen alle aromatische Aminosäuren, die in der Sequenz zumeist in der Mehrzahl sind.

Von den nicht phosphorylierten mit FIF markierten Peptiden sind deutlich mehr auch mit Fluorescein markiert zu finden als von den mit FIF markierten Phosphopeptiden. Das entspricht auch der Beobachtung, daß mit Fluorescein deutlich weniger Phosphopeptide als nicht phosphorylierte Peptide gefärbt werden.

Die Position der Phosphoaminosäure ist in 90% der Fälle die Mitte der Peptide. Das entspricht in etwa dem Gesamtanteil der Peptide mit den Phosphoaminosäuren in dieser Position.

Die Liste in Abbildung 3.19 zeigt die Werte der Fluoreszenzintensitäten und die Sequenzen der Peptide vor der FIF-Färbung, d.h. ohne daß eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt wurde. Dabei wurden nur Werte über 10000 berücksichtigt. Es treten gehäuft geladene Aminosäuren, vor allem solche mit positiven Ladungen, auf. In der Regel ist die Gesamtladung der Peptide positiv. Außerdem finden sich auch hier wieder viele aromatische Aminosäuren. Deutlich ist auch, daß wesentlich mehr nicht phosphorylierte Peptide markiert werden und daß diese außerdem markant intensiver fluoreszieren.

Abbildung 3.20 zeigt die Liste der Peptide, die nach der Färbung mit Fluorescein intensiv fluoreszieren. Auch hier wurden nur Werte über 10000 berücksichtigt. Wieder fällt das gehäufte Auftreten positiv geladener Aminosäuren auf, daneben finden sich aber auch erneut zahlreiche Peptide mit aromatischen Aminosäuren. Im Gegensatz zu der Liste der Fluoreszenzintensitäten ohne Färbung (siehe Abb. 3.19), finden sich hier aber auch einige Sequenzen ohne Ladungen oder aromatische Aminosäuren. Sie enthalten kleine Aminosäuren wie Alanin, Lysin oder Serin.

Spot- nummer	FIF/Phos- phopept.	Fluores- cein	FIF/nicht phosphor. Peptide	Sequenz	Spot- nummer	FIF/Phos- phopept.	Fluores- cein	FIF/nicht phosphor. Peptide	Sequenz
16	7702	-	-	AAAAAQy	322	18130			LYLyLYL
18	6691	-	-	AAAAAQs	325	12747			YLYyYLY
19	12815	-	-	QQQyQQQ	326	5197			YLYtYLY
28	6811		19558	KKKyKKK	331	11145			YLQyQLY
33	5403			AKAsAKA	334	12727	ja		QLYyYLQ
45	6127			AAAAARs	340	7142			LYQyQYL
46	13050	ja	8154	RRRyRRR	343	14095			LQYyYQL
47	11722	ja	10184	RRRtRRR	346	12087			YQLyYQL
48	9362		6829	RRRsRRR	349	14739			YLQyYLQ
49	5393	ja	9686	ARAyARA	352	8439			LYQyLYQ
76	7594	ja	8084	KERyREK	355	8757			SASySAS
80	5849	ja	7637	REKtKER	358	13600			SASyASA
85	5831	ja	12567	EKRyRKE	361	8968			AAAAATy
95	6595			KERtKER	364	14355	ja		TTTyTTT
100	6024			AAAAALy	367	5904			ATAyATA
103	15114	ja		LLLyLLL	369	5425			ATAsATA
105	9088	ja		LLLsLLL	370	11614			YAYyYAY
106	12594			ALAyALA	371	6326			YAYtYAY
121	9257			AAAAAFy	373	11874			YAYyAYA
122	8239			AAAAAFt	374	10277			YAYtAYA
124	25515			FFFyFFF	376	16820	ja		AAAyAAA
126	7732		6211	FFFsFFF	382	24290			VVVyVVV
127	13105			AFAyAFA	385	17441			AVAyAVA
130	8941	ja		AAAAAYy	388	22030			FAFyFAF
136	6997			AYAyAYA	390	8530			FAFsFAF
139	10235			AAAAASy	391	18341			FAFyAFA
142	13898			SSSySSS	393	5149			FAFsAFA
145	20444			ASAyASA	394	9008			GGGyAAA
172	9014	ja		AKFyFKA	397	13077			VVVyLLL
179	8870		10096	KFKtKFK	399	6958			IIlyPPP
180	5837		14390	KFKsKFK	401	5469			IIIsPPP
181	9798		18035	FKFyFKF	402	6980			WWWyCCC
238	6794	ja		AYKyKYA	404	5791			WWWsCCC
239	6366			AYKtKYA					
274	18112	ja		AQFyFQA					
275	6063			AQFtFQA					
277	13032			AFQyQFA					
280	11447			QFQyQFQ					
283	15583			FQFyQFQ					
284	7105			FQFtQFQ					
285	8320	ja		FQFsQFQ					
286	6878			ALFyFLA					
289	11385			AFLyLFA					
291	7025			AFLsLFA					
292	22157	ja		LFLyLFL					
294	6340	ja		LFLsLFL					
295	22826			FLFyFLF					
296	6648	ja		FLFtFLF					
298	11939			AQYyYQA					
301	7186			AYQyQYA					
304	5747			QYQyQYQ					
307	14557	ja		YQYyYQY					
316	14923	ja		ALYyYLA					
319	8988			AYLyLYA					

Abb. 3.17: Liste der mit FIF markierten Phosphopeptide

Spot-nummer	FIF/Pep-tide	Fluorescein	FIF/Phos-phopept.	Sequenz	Spot-nummer	FIF/Pep-tide	Fluorescein	FIF/Phos-phopept.	Sequenz
28	19558			KKKyKKK	259	6895			YKEyEKY
29	16901	ja		KKKtKKK	262	5954			KEYyYEK
30	7954			KKKsKKK	309	5488	ja		YQYsYQY
31	5482			AKAyAKA	337	5518	ja		QYLyLYQ
34	12433			KAKyAKA	350	5220			YLQtYLQ
35	6664			KAKtAKA	406	8250	ja		FFFFFFF
37	5798			KKKyEEE	411	10380			KKKKKKK
43	6178	ja		AAAAARy	412	5060			KKKKEEE
46	8154	ja	13050	RRRyRRR	413	9655	ja		KKKKFFK
47	10184	ja	11722	RRRtRRR	414	6244	ja		KFKFKFK
48	6829	ja	9362	RRRsRRR	417	7519	ja		RRRRRRR
49	9686	ja	5393	ARAyARA					
51	5127	ja		ARAsARA					
58	10816	ja		AAAAAHy					
62	16481	ja		HHHtHHH					
63	10582	ja		HHHsHHH					
74	5998	ja		KREtERK					
76	8084	ja	7594	KERyREK					
77	5350			KERtREK					
78	5712	ja		KERsREK					
79	6711	ja		REKyKER					
80	7637	ja	5849	REKtKER					
81	8963	ja		REKsKER					
82	9163	ja		RKEyEKR					
83	11427	ja		RKEtEKR					
84	10388	ja		RKEsEKR					
85	12567	ja	5831	EKRyRKE					
86	5058			EKRtRKE					
87	6375	ja		EKRsRKE					
89	7011	ja		ERKtKRE					
99	5315	ja		RKEsRKE					
115	5511			KKKyQQQ					
119	6477	ja		KQKtQKQ					
126	6211	ja	7732	FFFsFFF					
133	6435	ja		YYYyYYY					
134	5388	ja		YYYtYYY					
135	9945	ja		YYYsYYY					
167	6652	ja		AAAAFKt					
175	6674	ja		AFKyKFA					
176	9897			AFKtKFA					
177	8102			AFKsKFA					
178	14655	ja		KFKyKFK					
179	10096		8870	KFKtKFK					
180	14390			KFKsKFK					
181	18035		9798	FKFyFKF					
182	11891	ja		FKFtFKF					
183	10137	ja		FKFsFKF					
184	7098	ja		FEKyKEF					
190	5855	ja		EKFyFKE					
201	5855			KEFsFEK					
207	9172	ja		EKFyEKF					
208	5189	ja		EFKyEFK					
235	6986			AKYyYKA					
256	5817			EYKyKYE					
258	5386			EYKsKYE					

Abb. 3.18: Liste der mit FIF markierten nicht phosphorylierten Peptide

Spot- Nummer	Phospho- peptide	nicht phorsphory- lierte Peptide	Sequenz	Spot- Nummer	Phospho- peptide	nicht phorsphory- lierte Peptide	Sequenz
28	12175	21538	KKKyKKK	43		10532	AAAAARy
29		16751	KKKtKKK	45		13414	AAAAARs
30		17164	KKKsKKK	46	11271	12411	RRRyRRR
34		15167	KAKyAKA	47	15153	26996	RRRtRRR
61	19374	55528	HHHyHHH	48		27620	RRRsRRR
62	12605	42889	HHHtHHH	49		15036	ARAyARA
63	12150	42969	HHHsHHH	57	11745		RERsERE
64		24696	AHAyAHA	61	10607		HHHyHHH
65		19464	AHAtAHA	62		18703	HHHtHHH
66		21803	AHAsAHA	63		12237	HHHsHHH
67		34298	HHHyEEE	64		10927	AHAyAHA
68		27265	HHHtEEE	74	10246		KREtERK
69		35409	HHHsEEE	75		10681	KREsERK
70		24958	HEHyEHE	78		10158	KERsREK
71		18415	HEHtEHE	79		10169	REKyKER
72		19106	HEHsEHE	80		12462	REKtKER
76		16655	KERyREK	83	12436	11979	RKEtEKR
78		16803	KERsREK	85		15302	EKRyRKE
79		19932	REKyKER	91		17409	KREyKRE
82		18048	RKEyEKR	92		12192	KREtKRE
91		18968	KREyKRE	103	10663	10943	LLLyLLL
97		18036	RKEyRKE	104		11063	LLLtLLL
172		16307	AKFyFKA	105		10969	LLLsLLL
176	10049		AFKtKFA	107	10793		ALAtALA
178	10663	18686	KFKyKFK	124		20183	FFFyFFF
180	11465		KFKsKFK	125	11819	19607	FFFtFFF
184		17250	FEKyKEF	126		12529	FFFsFFF
196		15514	FKEyEKF	133	10482		YYYyYYY
201	10780		KEFsFEK	144		15364	SSSsSSS
202	10053	15140	KEFyKEF	146		10119	ASAtASA
204		18263	KEFsKEF	172		16286	AKFyFKA
241		17691	KYKyKYK	178		11760	KFKyKFK
243		15736	KYKsKYK	191		13380	EKFtFKE
244		17015	YKYyYKY	195		12446	EFKsKFE
246		20850	YKYsYKY	196		11439	FKEyEKF
247		17298	YEKyKEY	204		10650	KEFsKEF
256	10778		EYKyKYE	239		13576	AYKtKYA
402	22993	37178	WWWyCCC	244	10308		YKYyYKY
403	17436	31014	WWWtCCC	246		10956	YKYsYKY
404	17430	40486	WWWsCCC	265		11149	KEYyKEY
424		19707	KRKFRKR	269		12894	EKYtEKY
				286		11600	ALFyFLA
				291		11405	AFLsLFA
				292	10123	14233	LFLyLFL
				293		15392	LFLtLFL
				294		11568	LFLsLFL
				295		14544	FLFyFLF
				297		12937	FLFsFLF
				309		18731	YQYsYQY
				317		10540	ALYtYLA
				318		11240	ALYsYLA
				322		11857	LYLyLYL
				324		12334	LYLsLYL
				332		10091	YLQtQLY
				335		10708	QLYtYLQ
				346		11258	YQLyYQL

Abb. 3.19: Liste der Fluoreszenzwerte der Peptidspots vor der Färbung mit FIF

---

351	11857	10691	YLQsYLQ
373		10114	YAYyAYA
376	10417		AAAYAAA
379		11334	AAAAAVy
389		11612	FAFtFAF
406		18624	FFFFFFF
410		22571	FFFEFFF
417		16646	RRRRRRR
419		29429	RRRRFFR
420		29334	RFRFRFR
422		13632	ERRFRER
425		13627	KREFERK

Abb. 3.20: Liste der Fluoreszenzwerte der Peptidspots nach der Färbung mit Fluorescein

## 4. Diskussion

### 4.1 Theorie zum Färbeverhalten von Eisen(III)-Iminodiessigsäure-Fluorescein (FIF) [Eisen(III)-(N-ethyliminodiessigsäure-N'-fluorescein-thioharnstoff)]

Nach Abschluß der Experimente wurden die im folgenden dargestellten und diskutierten Punkte, die teilweise aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, teilweise aus Ergebnissen aus der Literatur abgeleitet worden sind, als Erklärung für das Färbeverhalten von FIF zusammengestellt. In der anschließenden Diskussion der Ergebnisse wurden sie dann für die Interpretation herangezogen.

Das Färbeverhalten von FIF (Abb. 1.1) dürfte sich auf seine drei Molekülbereiche zurückführen lassen:

- (1) Die Bindung von FIF an Peptide oder Proteine geschieht im wesentlichen über das Fe(III)-Chelat. Muszynska und ihre Mitarbeiter beobachteten 1992, daß die Bindung von Peptiden und Proteinen an Fe(III)-IDA mit steigendem pH-Wert geschwächt wird, und sie vermuteten außerdem, daß neben Phosphatresten auch Carboxylreste, insbesondere in räumlicher Nähe zu Phenolresten, gut binden können. Für die Chromatographie ermittelten Muszynska-G und Mitarbeiter 1986 empirisch, daß für die relativ spezifische Abtrennung von Phosphoproteinen oder -peptiden ein pH-Wert um 6 geeignet ist.
- (2) Der Fluoresceinrest hat aufgrund von drei Eigenschaften vermutlich wesentlichen Einfluß auf das Färbeverhalten von FIF:
  1. Die Fluoreszenz wird von Fluorescein mit zunehmendem pH-Wert intensiver, zwischen pH 6 und 7 besonders markant (Abb. 4.1). Der Grund für diese Abhängigkeit wird in Abb. 4.2 gezeigt. Bei niedrigeren pH-Werten kann Fluorescein Konformationen einnehmen, die nicht fluoreszieren, da das notwendige verzweigte  $\pi$ -System nicht vorliegt (Sun-W-C et al. 1997, Sjöback-R et al. 1995).
  2. Fluorescein trägt in der fluoreszierenden Konformation mindestens eine, ggf. aber auch zwei negative Ladungen, die an positive Ladungen binden und negative abstoßen können.
  3. Mit seinem aromatischen Anteil besitzt Fluorescein einen hydrophoben Bereich, der zu unspezifischen Bindungen führen könnte.



- (3) Der Harnstoffanteil des FIF ist chemisch einer Peptidbindung sehr ähnlich. Der doppelt gebundene Schwefel des FIF entspricht dabei dem Sauerstoff (siehe Abb. 1.1). Peptidbindungen besitzen Resonanzstrukturen, die dazu führen, daß ein elektrischer Dipol entsteht. Der Dipol im FIF dürfte vor allem mit den Dipolen im Peptidgerüst wechselwirken, insbesondere dann, wenn die Aminosäuren räumlich kleine und ungeladene Gruppen besitzen, die den Zugang leichter ermöglichen und wenn das Peptidgerüst flexibel ist, weil es beispielsweise nur aus wenigen Aminosäuren besteht. Der Harnstoffanteil dürfte damit für einen Teil des Bindungsverhaltens verantwortlich sein.

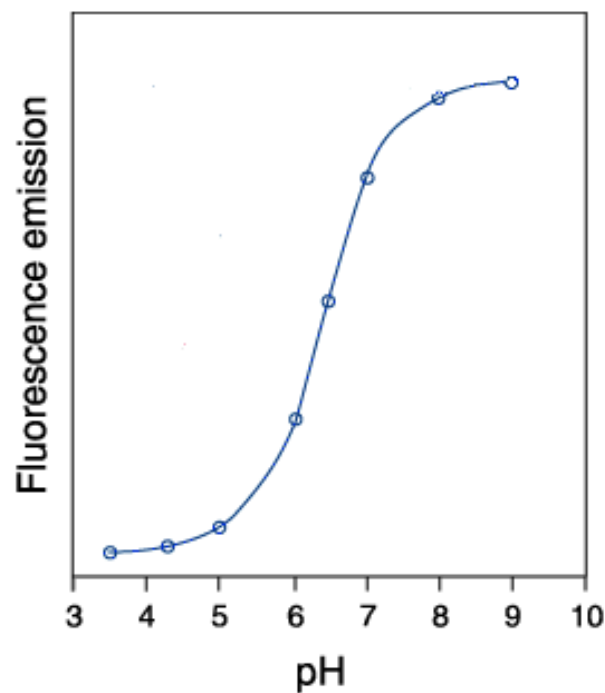


Abb. 4.1: Intensitätsverlauf der Fluoreszenz von Carboxyfluorescein in Abhängigkeit vom pH-Wert (Nach Haugland-RP 1996)

### Potentielle Liganden von Fe(III)-IDA und grundsätzliche Bindungsumstände

Fe(III) besitzt als IDA-Chelat noch drei freie Valenzen. Diese können von Liganden belegt werden, die Elektronenpaare für die Bindung zur Verfügung stellen können. Ohne weitere Zusätze können das in wässriger Lösung  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle,  $\text{OH}^-$ - oder auch  $\text{Cl}^-$ -Ionen sein. Fügt man Peptide oder Proteine zu, können bestimmte Aminosäuren als Liganden fungieren. Unter physiologischen Bedingungen liegen

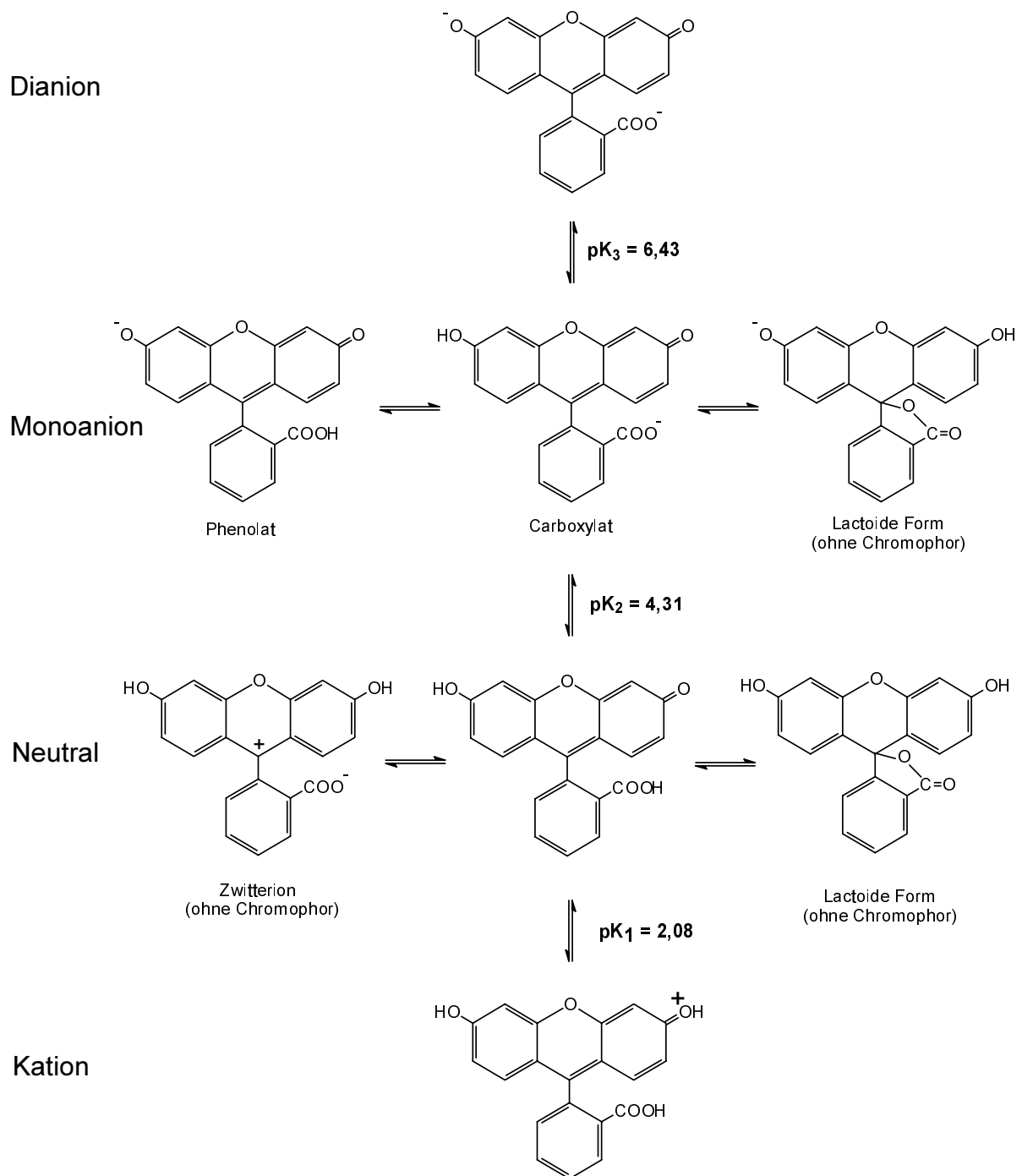


Abb. 4.2: Fluoresceinstrukturen in Abhängigkeit vom pH-Wert

neben Glutamat und Aspartat auch Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin deprotoniert - also negativ geladen - vor. Desweiteren könnten die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan über ihr  $\pi$ -System Elektronen zur Verfügung stellen. Beide Aminosäuregruppen sind deshalb potentielle Liganden. Welcher Ligand letztlich an das Fe(III) bindet, dürfte (a) von der

Bindungsstärke der einzelnen Bindung unter den gegebenen chemisch-physikalischen Bedingungen, (b) von seiner Konzentration und bei Mehrfachbindungen eines komplexeren Moleküls auch (c) von der Kompaktheit der Bindungsstellen abhängig sein.

Bei dem Standard-pH-Bereich für Bindungsreaktionen von Fe(III)-IDA um pH 6,0 liegt ein Phosphatrest in der Regel doppelt negativ geladen vor (Cooper-JA 1991) und ist damit ein stabiler Ligand für zwei freie Valenzen des Fe(III). Carboxylgruppen liegen bei pH 6,0 ebenfalls dissoziiert vor und sind damit potentielle Bindungskandidaten für die freien Valenzen. Da sie nur jeweils eine Bindungsmöglichkeit besitzen, dürfte die Bindung nicht so stabil sein wie die eines Phosphatrestes. Darüber hinaus führt die Mesomerie der deprotonierten Carboxylgruppe dazu, daß das Elektronenpaar weniger leicht für die Bindung an das Fe(III) zur Verfügung gestellt werden kann. Dies kann die bevorzugte Bindung von Phosphopeptiden und -proteinen, aber auch die Bindung von an Carboxylgruppen reichen Peptiden und Proteinen an Fe(III)-IDA erklären, wie sie in der Chromatographie beobachtet wurde (Muszynska-G et al. 1992).

Welche Liganden unter welchen Umständen letztlich an das Fe(III) binden, ist neben der chemischen Natur der beteiligten Gruppen, deren benachbarten Gruppen und ihrer Konzentration auch noch von den räumlichen Verhältnissen, also der Zugänglichkeit und Flexibilität der beteiligten potentiellen Bindungspartner, abhängig. So bestimmen die sterischen Verhältnisse, ob drei Carboxylgruppen gleichzeitig an das Fe(III) binden. Die Summe der Faktoren macht eine verlässliche Voraussage über die Bindungen nur selten möglich.

### **Neue Grundannahmen zur Theorie des Färbeverhaltens von FIF**

- I) In der Fe(III)-Chelat-Chromatographie wurde beobachtet, daß ein Zusammenhang zwischen Bindungsstärke eines Liganden und dem pH-Wert existiert (siehe z.B. Muszynska-G et al. 1992). Je höher der pH-Wert, desto schwächer wird ein Ligand gebunden und umso schneller eluiert. Die Erklärung für diesen Befund könnte in der Konzentration der OH<sup>-</sup>-Ionen liegen, die bei einem höheren pH-Wert höher konzentriert vorliegen. Da auch sie mögliche Liganden sind, können sie die um die Bindung konkurrierenden Liganden verdrängen.
- II) Der pH-Wert spielt bei FIF, als Besonderheit gegenüber der Fe(III)-IDA-Chromatographie, noch eine weitere Rolle. Die pH-Wert-Optima für die Bindung eines Liganden an das Chelat und die Fluoreszenzintensität von Fluorescein (siehe oben unter (2)) stimmen nicht überein. Erst bei pH-Werten über 7 zeigt Fluorescein eine hohe Fluoreszenzintensität (Abb. 4.1). Die

- Bindung möglicher Liganden an das Fe(III)-IDA ist dagegen, wie bereits angesprochen, bei niedrigeren pH-Werten stabiler. Die Empfindlichkeit der Detektion ist also in dem pH-Wert-Bereich, bei dem eine Farbstoffbindung günstig ist, deutlich geringer als theoretisch möglich.
- III) Eine dritte wesentliche Annahme kann eine Erklärung für die in der Arbeit und auch in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse, die bisher noch unzureichend erklärt worden sind, liefern. Sie besagt, daß sich in der sehr nahen Umgebung (Mikroumgebung) der Bindungs- und Fluoreszenzphänomene in Abhängigkeit der dort befindlichen, immobilisierten Ladungen der pH-Wert von dem des umgebenden Puffers unterscheiden kann (siehe Abb. 4.3).
- IV) Eine weitere Annahme ist, daß Aminogruppen mit Carboxyl-, aber auch mit Phosphatgruppen wechselwirken können, sofern sie zugänglich und flexibel genug sind. Die Wasserstoffbrücken, welche sich ausbilden könnten, wären möglicherweise stark genug und / oder würden die Gruppen so verdrehen, daß die Bindung an das Chelat erschwert bzw. verhindert würde.
- V) Da die Carboxylgruppe des Fluoresceinrestes an FIF um pH 6 bevorzugt deprotoniert vorliegt, könnte es zu einer Dimerisierung von FIF-Molekülen kommen. Dabei könnten die freien Valenzen des Fe(III) mit der Carboxylgruppe des Fluoresceinrestes des jeweils anderen FIF-Moleküls über Kreuz wechselwirken. Diese Bindung wäre stärker als eine einfache Bindung eines Chelates an eine Carboxylgruppe. Dimere dürften schlechter bzw. gar nicht an die zu markierenden Liganden binden und damit die Färbung stören. Möglicherweise ist das aber durch eine einfache Erhöhung der Farbstoffmenge ausgleichbar. In der Kapillarelektrophorese könnten Dimere die Ursache für den dort beobachteten FIF-Doppelpeak sein (siehe Abb. 3.7).

### **Zu III):      Argumentation für einen Einfluß der Mikroumgebung**

Bei der Immobilisierung von Enzymen an geladenen Trägermaterialien ist das Phänomen der Verschiebung des pH-Wert-Optimums zu beobachten (Yabushita-Y 1988, Goheer-MA et al. 1976). Hartmeier-W (1986) erklärt dazu, daß die Ladungen der Matrix die jeweiligen Gegenionen aus der umgebenden Lösung anziehen und sich dadurch eine Schicht bildet, in der der pH-Wert entsprechend verschoben ist. Bei einer beispielsweise aufgrund von deprotonierten Carboxylgruppen negativ geladenen Matrix würden sich Protonen anreichern und der pH-Wert in der Mikroumgebung somit sinken. Da der pH-Wert im Bereich der Enzymaktivität also etwas niedriger liegt als im umgebenden Puffer, erscheint der pH-Wert für die optimale Enzymaktivität entsprechend erhöht.

Mikroumgebung  $\text{pH} > 6,0$

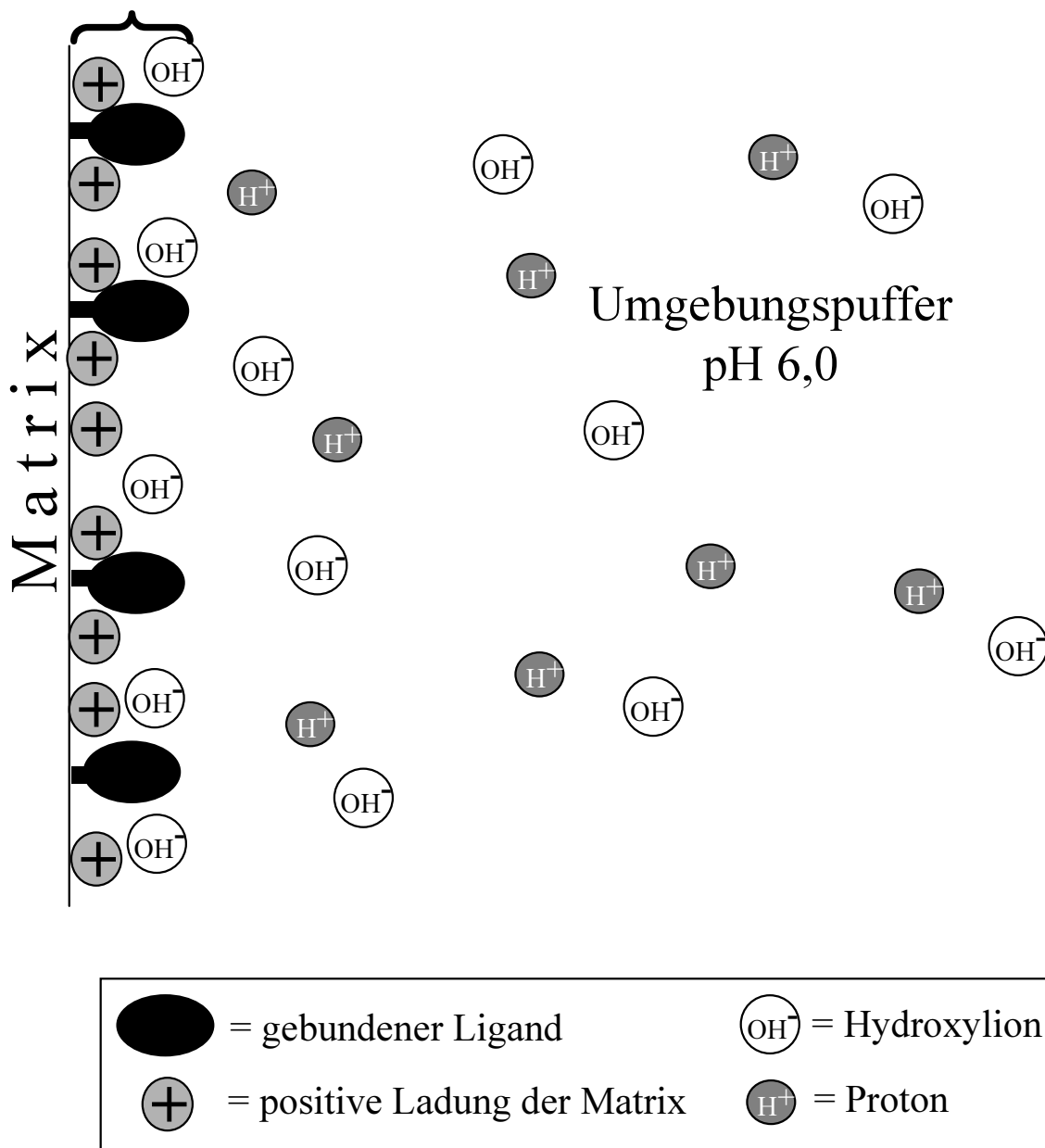


Abb. 4.3: Modell der pH-Wert-Verschiebung in der Mikroumgebung von Liganden durch immobilisierte Ladungen an der Matrix

Im Fall von Proteinen und Peptiden, die an eine Matrix immobilisiert werden, kann eine lokale pH-Wert-Verschiebung durch die damit verbundene Immobilisierung geladener Gruppen, also der Carboxyl- oder Aminogruppen von Glutamat, Aspartat, Lysin, Arginin oder Histidin, auf engem Raum auftreten. Der pH-Wert der umgebenden Lösung und die Pufferkapazität bestimmen in Abhängigkeit

der betroffenen pK-Werte letztlich, ob die Aminosäuren geladen oder ungeladen vorliegen. Im ersten Fall kann es zu einer Verschiebung des pH-Wertes in der Mikroumgebung kommen.

Ein Einfluß von Aminosäureseitenketten auf benachbarte Gruppen zeigt sich auch in der Veränderung von deren pK-Werten von bis 2 und mehr pH-Einheiten. Dieses Phänomen kann die pH-Optima für enzymatische Reaktionen gegenüber einer nicht den pK-Wert beeinflussenden Umgebung markant verschieben (Lehninger-AL et al. 1994).

### **Mit der Theorie zum Färbeverhalten von FIF erklärare Phänomene aus der Literatur**

Gast-R beobachtete 1999, daß an Carboxylgruppen reiche Peptide von FIF zwar gebunden werden, daß die Fluoreszenz aber unter normalen Färbebedingungen weniger intensiv war als erwartet. Er vermutete einen Quencheffekt, der in der Literatur (Chen-RF und Knutson-JR 1988) bereits beschrieben ist und auf einen Energietransfer auf nicht fluoreszente Dimere von Fluorescein zurückgeführt wird, die sich bei hohen Farbstoffkonzentrationen bilden. Des weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit keine Peptide mit Glutamaten markiert. Dieser Befund steht der Beobachtung von Muszynska und ihren Mitarbeitern gegenüber, die 1992 verschiedene an Glutamat reiche Peptide in der Fe(III)-IDA-Chromatographie untersuchten. Peptide mit etwa 100-200 Glutamaten und 15-50 Tyrosinen wurden dabei etwa so stark gebunden wie deutlich kürzere Phosphopeptide. Welche Rolle möglicherweise der Unterschied in der Länge der Peptide von Muszynska und Gast bzw. in der vorliegenden Arbeit spielt, ist dabei unklar. Eher gegen den Quencheffekt spricht die Beobachtung von Gast, daß eine Erhöhung der Farbstoffmenge die Unterscheidbarkeit von Phosphopeptiden und deren nicht phosphorylierten Analoga verbessert, da der Quencheffekt auf einer hohen Konzentration von Fluorescein beruht. Wenn also die Farbstoffmenge erhöht wird, sollte auch die Konzentration zunehmen und den Quencheffekt eher verstärken. Vielmehr scheint es daher wahrscheinlich, daß die pH-Wert-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Fluorescein (siehe Abb. 4.1) dafür wesentlich verantwortlich ist und die Annahme einer pH-Wert-Erniedrigung in der Mikroumgebung des Fluoresceinrestes zutrifft, so daß trotz anzunehmender großer Mengen an gebundenem Farbstoff nur eine geringe Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden kann. Nach dieser Hypothese kann eine Erhöhung der Farbstoffmenge zu dem von Gast beschriebenen Effekt führen.

Die Peptidspots stellen Bereiche dar, in denen Peptide und damit auch ihre Ladungen konzentriert werden. So kann der pH-Wert der Mikroumgebung des Fluoresceinrestes von dem der umgebenden

Lösung abweichen und damit die Intensität der Fluoreszenz beeinflussen. Dieser Effekt dürfte auch bei Verschiebungen von weniger als einer pH-Einheit die Färbung beeinflussen, da, wie die Intensitätskurve der Fluoreszenz von Fluorescein zeigt (Abb. 4.1), der Einfluß einer pH-Wert-Verschiebung im Bereich um pH 6,0, dem pH-Wert des Puffers bei der Detektion also, sehr ausgeprägt ist.

An die an Carboxylgruppen reichen, an Beads gebundenen Peptide, die Gast-R untersuchte, dürfte mehr FIF gebunden haben als an die Masse der Beads mit anderen Peptiden. Der pH-Wert der Mikroumgebung der an Carboxylgruppen reichen Peptide war vermutlich aber gleichzeitig so viel niedriger, daß bei ihnen die Fluoreszenzintensität insgesamt nicht erhöht war.

Eine Verschiebung des pH-Wertes in der Mikroumgebung dürfte aber nicht nur einen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität haben, sondern auch auf die Bindung an das Chelat wirken. Liegen in einem Peptid neben Carboxylgruppen auch mehrere Aminogruppen vor, so steigt auch der pH-Wert der Mikroumgebung und damit die Konzentration von OH<sup>-</sup>-Ionen. Damit werden mehr Carboxylgruppen von der Bindung an das Chelat verdrängt. Zudem werden die Ladungen der sauren und basischen Gruppen zu internen Wechselwirkungen führen, die eine Bindung an das Chelat stören. Umgekehrt dürfte auch eine saure Mikroumgebung für eine bessere Bindung der in Frage kommenden Aminosäureliganden führen, da die Konzentration der OH<sup>-</sup>-Ionen dann niedriger ist.

Dieser Ansatz könnte erklären, warum Carboxyl- und Phenolgruppen, wie aus der Chromatographie bekannt (Muszynska et al. 1992), in Kombination besonders gut an das Fe(III) binden. Beide Gruppen dürften zwar bereits isoliert als Liganden fungieren können, sinkt jedoch der pH-Wert, wie es vermutlich der Fall ist, wenn viele Carboxylgruppen aneinandergebunden vorliegen, wird die Konkurrenz um die Bindung durch die OH<sup>-</sup>-Ionen geringer. Dadurch wird die Bindung eher möglich, also stabiler. Muszynska et al. vermuteten 1992, daß die Bindung der Carboxylgruppen an Fe(III) durch die Beteiligung der  $\pi$ -Elektronen des aromatischen Ringes verstärkt werden könnte. Möglicherweise ist der Zusammenhang eher umgekehrt derart, daß die pH-Wert-Verschiebung, die durch viele Carboxylgruppen auf engem Raum bewirkt werden könnte, neben den eigenen auch die Bindungsbedingungen der Phenolgruppen verbessert, indem die Konkurrenz durch die OH<sup>-</sup>-Ionen verringert wird.

**Die Behandlung mit EDC/Ethylendiamin**

(siehe auch 2.1.2.2, 2.2.5 und 4.1)

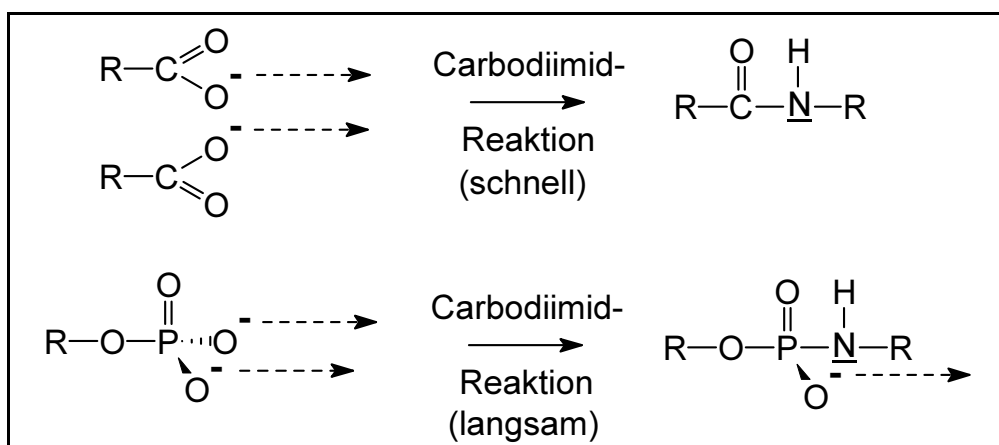


Abb. 4.4: Bindungsmodelle von Carboxyl- und Phosphatgruppen an komplexiertes Fe(III) vor und nach einer Carbodiimidreaktion

Die Behandlung mit EDC/Ethylendiamin führt zu einer Veränderung der Bindungsmöglichkeiten. Carboxylreste werden zu den entsprechenden Ethylendiamin-Derivaten modifiziert (siehe Abb. 4.4) und verlieren die Bindungsfähigkeit an das Fe(III). Auch Phosphatreste können mit EDC/Ethylendiamin derivatisiert werden (siehe Abb. 4.4). Da sie aber wesentlich weniger reaktiv sind, läßt sich durch eine angemessen kurze Reaktionszeit, die ggf. erst ermittelt werden muß, ihre Modifikation verhindern (Pierce). Durch die Umwandlung von Carboxyl- in Aminogruppen sollte sich der pH-Wert in der Mikroumgebung markant ändern können, wenn eine größere Zahl an Carboxylgruppen vorlagen. Das hat vermutlich den oben angesprochenen Effekt, daß die Fluoreszenzintensität im Fall einer FIF-Bindung erhöht, die Bindung an das betroffene Protein oder Peptid insgesamt aber geschwächt sein dürfte, da bei höherem pH-Wert die Bindung der potentiellen Liganden an das Fe(III)-Chelat aufgrund der höheren  $\text{OH}^-$ -Ionen-Konzentration, die vermutlich zur Verdrängung anderer Liganden führt (s.o.), geschwächt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen zumindest für die Hypothese der Erhöhung der Fluoreszenzintensität (siehe 4.2.4).

Möglicherweise führt die Zunahme der Zahl der Aminogruppen dazu, daß vermehrt Wechselwirkungen mit Phosphatgruppen auftreten, die zu einer Behinderung der Bindung des FIF führen könnten. Dieser Effekt würde eine Verringerung der Detektierbarkeit auch von Phosphatgruppen bedeuten und damit den positiven Effekten gegenüberstehen. Er dürfte insbesondere für die in der Regel flexibleren Peptide gelten, weniger für Proteine.



## 4.2 Diskussion der Ergebnisse der Arbeit

### 4.2.1 Allgemeine Fehler bei der Entwicklung der Färbemethode

Die Ergebnisse bei der Entwicklung der Färbemethode mit FIF zeigen z.T. höhere Differenzen in den Helligkeitswerten prinzipiell gleicher Spots auf verschiedenen Membranen. Hauptgrund hierfür dürfte das manuelle Aufbringen der Proben sein, was Pipettierfehler bedingt. Dabei spielen weniger schwankende Volumina als vielmehr unterschiedliche Auftragsflächen eine Rolle, da die Membranen die Proteinlösungen nicht immer gleich gut aufnehmen und weil sowohl der Auftragswinkel als auch die Pipettiergeschwindigkeit einen Einfluß auf die resultierende Fläche haben. Daneben hat sich in manchen Fällen offenbar ausgewirkt, daß gleiche Membranen jeweils im selben Färbegefäß inkubiert wurden und dabei z.T. aneinander hafteten, so daß eine gleichmäßige Benetzung und damit Färbung gestört wurde. Ebenfalls zu berücksichtigen ist der mögliche Fehler, der bei der Detektion dadurch zustande kommt, daß die Membranstücke nicht exakt eben auf der Unterlage aufliegen. So können Unterschiede in der Belichtungsintensität und damit auch in der Fluoreszenzdetektion resultieren.

### 4.2.2 Membranmaterial (siehe 2.2.6 und 3.1.1)

Die Färbung von Ovalbumin und Glucoseoxidase auf verschiedenen Membranen mit FIF zeigte, daß Nitrocellulose das am besten geeignete Material für die Färbung ist. Die Hintergrundfluoreszenz ist gering, die Proteinspots sind gut sichtbar. Bei den Peptidmembranversuchen (siehe 3.6.2 und 3.7) zeigte sich später, daß auch Cellulose für die Färbung verwendet werden kann.

Eine Betrachtung der chemischen Natur der verwendeten Matrices unter Berücksichtigung der oben aufgestellten Theorie zum Färbeverhalten von FIF gibt Aufschluß über die möglichen Ursachen. Der Begriff Nylon steht ursprünglich für ein Polykondensationsprodukt von Hexandiamin und Adipinsäure, wird aber allgemeiner für lineare, aliphatische Polyamide verwendet (Römpp 1998). Für die Anwendung als Blotmembran wird in der Regel modifiziertes Material eingesetzt, dabei vor allem, wie auch in der vorliegenden Arbeit, positiv geladenes Nylon (Lottspeich-F und Zorbas-H 1999). Die Art der Modifizierung ist jeweils Firmengeheimnis. Das Ergebnis der Färbung von Nylonmembranproben mit FIF dürfte durch zwei Effekte wesentlich beeinflusst sein: (1) Die hydrophobe Natur der Matrix dürfte für unspezifische Bindungen des FIF über den Fluoresceinanteil sorgen. (2) Die positiven Ladungen führen zu einer Erhöhung des pH-Wertes in der Mikroumgebung des Nylon. Dies kann zwar die Bindung des FIF an die Proteine erschweren, erhöht aber die Fluoreszenzintensität über

den gesamten Membranbereich.

Polyvinylidenfluorid (PVDF) besteht aus  $n$  Monomeren  $-\text{CH}_2-\text{CF}_2-$  und ist damit, wie Nylon, ein hydrophobes Material. Hier kann der Fluoresceinanteil ebenfalls unspezifisch binden, allerdings fehlen die geladenen Gruppen, so daß kein entscheidender Einfluß auf die Bindung des Chelatfarbstoffes und auf die Fluoreszenzintensität zu erwarten ist. Die Proteine belegen, an den Stellen, an denen sie aufgebracht wurden, die Matrix und verhindern dadurch die unspezifische Bindung von FIF. Weil die Matrix keine Ladungen trägt, die Einfluß auf die Fluoreszenzintensität haben könnten, fluoreszieren die Proteine vermutlich vergleichbar wie an Nitrocellulose. Der gleichmäßig hohe Hintergrund führt gegebenenfalls in Kombination mit den weniger intensiv fluoreszierenden Proteinen zu einer Art "Negativfärbung" (siehe auch 3.1.2).

Cellulose, das bei den Peptidmembranen zum Einsatz kam, besitzt als Homopolysaccharid von Glucose ebenso wie Nitrocellulose zahlreiche Hydroxylgruppen. Allerdings sind diese schlecht zugänglich und bilden, z.T. auch mit den Sauerstoffen im Ringsystem, interne Wasserstoffbrücken. Dadurch ist Cellulose weniger hydrophil (Lehninger-AL 1994).

Der gebräuchliche Namensteil Nitro- ist nach chemischer Namensgebung für die Nitrocellulose unkorrekt. Diese ist eigentlich Cellulosenitrat, da sie im Gegensatz zu Cellulose an einigen Stellen Nitrat- statt Hydroxylgruppen besitzt.

Da bei beiden Materialien keine Ladungen und keine hydrophoben Reste vorhanden sind, ist die Hintergrundfärbung schwach. Gefärbte Proteine und Peptide sind deshalb gut sichtbar.

Ovalbumin ist gegenüber Glucoseoxidase das deutlich stärker mit Fluoreszenz markierte Protein. Dennoch wird deutlich, daß auch nicht phosphorylierte Proteine gefärbt werden können. Das entspricht generell den Erfahrungen von Pierce mit INDIA™ PhosphoProbe-HRP (Pierce). Diese geben allerdings an, daß die Behandlung mit EDC/Ethylendiamin den Nachweis spezifisch macht. Da FIF durchaus etwas andere Bindungseigenschaften besitzen dürfte als das Pierce-Produkt, mag hier ein Unterschied auftreten. Die genaueren Untersuchungen der Bindung von FIF an nicht vorbehandelte Peptide in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz werden unter 4.2.13, die Wirkung der Behandlung mit EDC/Ethylendiamin unter 4.2.4 diskutiert.

Das Experiment zeigt schließlich auch, daß der 50mM MES-Puffer mit 1M NaCl bei pH 6,0 für die Färbung geeignet ist. Bei der Auswahl des Puffers war zu bedenken, daß verschiedene Substanzen oder Bedingungen die Bindung des FIF an die Phosphoproteine oder -peptide ggf. störend

beeinflussen. Beispielsweise können Phosphatpuffer und solche Puffer, die komplexierende Wirkung haben, z.B. Polycarbonsäuren wie Citrat, nicht verwendet werden. Des weiteren sind Zusätze wie verschiedene Metallionen oder EDTA schon in geringen Konzentrationen nicht einsetzbar, weil auch sie alle unmittelbar mit einem der Bindungspartner wechselwirken. So können Phosphatpuffer und Mg(II)-Salze zur Elution eines Liganden eingesetzt werden und EDTA zur Regenerierung der IDA-Sepharose, d.h. zur Elution des Fe(III) (Muszynska-G et al. 1992). Nach eigenen Erkenntnissen aus der Chromatographie (nicht gezeigt) gehört auch SDS schon in Konzentrationen unter 0,1% zu den störenden Substanzen. Entscheidend war außerdem, daß der pH-Wert des eingesetzten Puffers den Bindungsbedingungen entsprach und damit um pH 6,0 puffern mußte.

#### **4.2.3 Temperaturabhängigkeit** (siehe 2.2.7 und 3.1.2)

Die Verwendung einer Temperatur zwischen 60°C und 80°C bei einer Färbedauer von mindestens 30 bis 60min ist nach den vorliegenden Ergebnissen am günstigsten.

Bei der Coomassie-Färbung (siehe auch 2.7.6) läßt sich die Farbreaktion durch eine Erhöhung der Färbetemperatur ebenfalls beschleunigen (Westermeier-R 1993). Dieser Effekt, der auf die erhöhte Reaktionsenergie zurückzuführen ist, läßt sich bei der Färbung mit FIF ebenfalls nutzen (siehe 3.1.2). Mit der Temperaturerhöhung ist eine erhöhte Spezifität der Färbung für Phosphoproteine zu beobachten. Das ist erklärbar, wenn angenommen wird, daß die im Sinne der Phosphoproteinfärbung nicht spezifisch gefärbten Proteine eine niedrigere Bindungsenergie als die spezifisch gefärbten besitzen, die bei der Zunahme der Reaktionsenergie durch die Temperaturerhöhung eher überschritten wird. Die Wirkung auf die Dissoziation des FIF von den nicht phosphorylierten Proteinen wäre also größer.

Das Phosphoprotein Phosvitin ließ sich in diesem Versuch nur ungenügend färben. Das kann verschiedene Ursachen haben. Vom pI-Wert eines Proteins läßt sich seine relative Gesamtladung bei einem gegebenen pH-Wert und damit wiederum der Einfluß auf den pH-Wert der durch das Protein erzeugten Mikroumgebung ableiten. Der pI-Wert von Phosvitin beträgt etwa 4,4 und müßte damit ungünstig für die Fluoreszenzintensität des FIF sein (Ovalbumin hat einen höheren pI-Wert von etwa 5,2), da der pH-Wert der Mikroumgebung gesenkt werden dürfte (siehe dazu Abb. 4.3). Die Berechnung des pI-Wertes basiert zudem auf der unphosphorylierten Aminosäuresequenz. Bei einem Phosphorylierungsgrad von 8 bis 10%, wie er bei dem verwendeten Phosvitin vorliegt (Sigma

Produktkatalog), dürfte der pI-Wert noch deutlich sinken. Da Phosvitin im Hühnerei die Funktion eines Eisenspeichers hat (Römpp), ist des weiteren möglich, daß bereits Eisen gebunden vorliegt, so daß weniger FIF gebunden wird als theoretisch möglich. In der Chromatographie wurde gezeigt, daß Phosvitin unter ähnlichen Versuchsbedingungen gut an Fe(III)-IDA-Sepharose bindet (Andersson-L und Porath-J 1986, Muszynska-G et al. 1986 und 1992). Allerdings könnten die Phosvitin-Chargen unterschiedlich sein. Dennoch ist der niedrige pI-Wert die wahrscheinlichere Ursache für die schlechte Detektierbarkeit.

Da das Experiment vor der Erkenntnis durchgeführt wurde, daß eine Temperaturerhöhung bei MES den pH-Wert um 0,011 pro 1°C senkt (siehe 2.2.9), wäre es denkbar, daß es bei der Färbung mit höheren Temperaturen zu einer leichten Überfärbung durch den niedrigeren pH-Wert gekommen ist. Allerdings wurden die Proben unmittelbar nach der Färbung in dem Waschpuffer mit pH 6 bei Raumtemperatur inkubiert. Daher ist anzunehmen, daß mögliche Überfärbungen zumindest wieder geschwächt worden sind. Da weder die Hintergrundfärbung verstärkt ist, wie das bei der gezielten pH-Wert-Senkung der Fall war (siehe 2.2.9), noch eine deutlichere Färbung aller Proteine zu erkennen ist, sondern im Gegenteil sogar eine Tendenz, daß zumindest nicht phosphorylierte Proteine weniger intensiv fluoreszieren, scheint letzteres wahrscheinlicher.

#### **4.2.4 Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin und BSA** (siehe 2.2.8 und 3.1.3)

Das Abreagieren der Carboxylgruppen zu Aminogruppen müßte nach der Theorie zum Färbeverhalten von FIF (siehe 4.1) zu zwei Effekten führen, die sich in den Ergebnissen wiederfinden lassen sollten. Zum einen sollte die unspezifische Bindung des Chelats an Carboxylgruppen und damit die dadurch mögliche unspezifische Markierung vermindert werden. Das läßt sich mit den Ergebnissen nicht bestätigen. Die nicht phosphorylierte Glucoseoxidase wird nach der Behandlung mit EDC/Ethylendiamin markiert.

Zum anderen sollte der pH-Wert der Mikroumgebung in den basischeren Bereich verschoben und dadurch die Fluoreszenz des Fluoresceinanteils intensiviert werden. Insgesamt dürfte die Bindung des FIF an Proteine durch die lokale pH-Wert-Erhöhung und eine mögliche Wechselwirkung der Aminogruppen mit den Phosphatgruppen zwar geschwächt werden. Eine Intensivierung der Fluoreszenz ist dennoch deutlich zu erkennen, insbesondere bei der 70°C-Färbung (siehe Abb. 3.3 A).

Beide Effekte sind auch bei den anderen Experimenten zu beobachten. Bei dem Temperaturtest (siehe 3.1.2) waren die Probestreifen mit EDC/Ethylendiamin vorbehandelt worden. Hier sind auch die Spots von Glucoseoxidase zu sehen. Außerdem fluoreszieren alle Spots deutlich intensiver als die aus den Experimenten zum pH-Wert-Einfluß (siehe 3.1.4), bei denen keine Vorbehandlung durchgeführt worden war.

Die Firma Pierce schreibt die Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin für INDIA™ PhosphoProbe-HRP vor, um die spezifische Markierung von phosphorylierten Proteinen zu gewährleisten. Die Unterschiede der Chelatoren und der Detektionsanteile zwischen FIF und dem Pierceprodukt könnten erklären, warum der Effekt bei FIF nicht erfolgreich ist (bei einem nicht gezeigten Test wurde Glucoseoxidase in der Tat im Gegensatz zu Casein nicht mit INDIA™ PhosphoProbe-HRP markiert). Es kann davon ausgegangen werden, daß die Abreaktion der Carboxylgruppen nicht vollständig war. Möglicherweise ist FIF dafür empfindlicher. In der Vorschrift von Pierce wird angeraten, die Reaktionszeiten der Vorbehandlung zu optimieren. Möglicherweise könnte eine Verlängerung der Reaktionszeit für die Markierung mit FIF eine Verbesserung der Spezifität bringen.

Das Blocken mit BSA führt zu einer sehr ungleichmäßigen und starken Hintergrundfärbung. Das Aneinanderhaften der Probestreifen während des Blockens könnte zu einer ungleichmäßigen Belegung mit BSA geführt haben, da die geringer fluoreszierenden Bereiche der Form anderer, quer aufliegender Membranstreifen entsprechen. Daß trotz Abreaktion der Carboxylgruppen offenbar FIF auch an BSA bindet und stärker als auf dem Caseinspot (mit einem pI-Wert von etwa 5,7) fluoresziert, könnte an der großen Menge an BSA liegen, die gebunden wird. Zudem dürfte der pI-Wert des BSA von etwa 5,6 durch die Vorbehandlung deutlich erhöht werden, so daß der resultierende pH-Wert in der Mikroumgebung für eine hohe Fluoreszenzintensität sorgt (siehe dazu auch Abb. 4.3 und Abb. 4.1). Möglicherweise wird der pI-Wert des BSA auch deutlich mehr erhöht als der von Casein. Da das Blocken mit BSA in der Vorschrift für die Anwendung von INDIA™-Phosphoprobe-HRP Routine ist, sollte die Hintergrundfärbung durch die Bindung des Chelatanteils nicht markant sein. Entweder ist also die Verstärkung der Fluoreszenz aufgrund des erhöhten lokalen pH-Wertes ausschlaggebend und /oder eine unspezifische Bindung über den Fluoresceinanteil. In beiden Fällen ist ein Blocken mit BSA mit der FIF-Färbung nicht kombinierbar.

Bei PVDF erbrachte keine der Vorbehandlungen ein gutes Resultat. Die Unschärfe der einzig sichtbaren Spots, der Caseinspots der 80°C-Färbung nach EDC-Behandlung (siehe Abb. 3.3), ist auf

die zu große Menge an Methanol zurückzuführen, die vor dem Aufpipettieren des Proteins auf die Membran gegeben wurde, was ein Verlaufen der Probe zur Folge hatte. PVDF zeigt insgesamt eine intensivere und ungleichmäßigere Hintergrundfärbung als Nitrocellulose und erweist sich damit wiederum als ungeeignet.

Auf der fünften Probe in der ersten Spalte der Abbildung 3.3 erkennt man einen helleren und einen dunkleren Bereich. Dies ist auf einen Knick des Membranstückes zurückzuführen, der zu einem Schatten des Anregungslichts führt. Das Problem solcher Schatten ist bei den Experimenten zu dieser Arbeit häufiger aufgetreten und wurde schon in 4.2.1 angesprochen. Vermutlich sind die 30°C-Proben insgesamt etwas schlechter bestrahlt, da das Temperaturexperiment (siehe 4.2.3) solch hohe Unterschiede bei der Hintergrundfärbung und den Proteinspots nicht erwarten ließ, zumindest nicht nach EDC/Ethylendiamin-Vorbehandlung.

#### **4.2.5 pH-Wert-Einfluß** (siehe 2.2.9 und 3.1.4)

Studien, die bei der Chromatographie mit Fe(III)-IDA gemacht wurden (Andersson-L und Porath-J 1986, Muszynska-G et al. 1986 und 1992), haben gezeigt, daß einerseits ein niedriger pH-Wert die Bindungen unspezifischer Sequenzen eher ermöglicht, ein hoher andererseits zu allgemein schlechter Bindung führt. Dieser Effekt ist bei den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls zu beobachten. Bei den Proben mit der größeren Proteinmenge sind bei pH 5,5 alle Proteine zu sehen und auch die Färbung der Membran ist am intensivsten. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die Fluoreszenzintensität der Proteine, im Fall von Casein und Glucoseoxidase sogar schneller als die des Hintergrundes („Negativspots“), ab. Ovalbumin ist bis etwa pH 6,5 am besten zu sehen. Die Erklärung für das Phänomen liefert die Theorie zum Färbeverhalten von FIF (siehe 4.1). Mit zunehmendem pH-Wert verdrängen die höher konzentrierten OH<sup>-</sup>-Ionen das FIF. Ein Einfluß des pH-Wertes auf die Fluoreszenz ist auszuschließen, da alle Proben bei pH 5,5 nachgewaschen und schließlich detektiert worden sind.

Die Fluoreszenzintensität bei den Experimenten war insgesamt gering. Das zeigte sich besonders klar bei Casein, das sich bei der Färbung nach Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin deutlich besser detektieren ließ (siehe Abb. 3.3 A). Die Gründe hierfür dürften zum einen der im Vergleich zu den anderen Experimenten um 0,5 Einheiten niedrigere pH-Wert bei der Detektion und zum anderen der Verzicht auf die EDC/Ethylendiamin-Reaktion sein. Der niedrigere pH-Wert bei der Detektion

schwächt die Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 4.1). Die Reaktion mit EDC/Ethylendiamin bewirkt eine pH-Wert-Erhöhung in der Mikroumgebung (siehe Abb. 4.3), so daß der Verzicht zu einer geringeren Fluoreszenzintensität führt.

#### **4.2.6 Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration** (siehe 2.2.10 und 3.1.5)

Das Färben mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen hat deutlich gemacht, daß mit einer Erhöhung der Konzentration des FIF auch die Hintergrundfärbung zunimmt. Obwohl die Proteinkonzentration zu niedrig gewählt war, um ohne EDC/Ethylendiamin-Behandlung die Spots gut sehen zu können, wird ersichtlich, daß eine Konzentrationserhöhung das Detektionsergebnis nicht wesentlich verbessert. Mit einer Verlängerung der Detektionszeit läßt sich auch bei geringeren FIF-Konzentrationen markiertes Protein sehen. Ob eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration bei der Färbung das Verhältnis von Hintergrundfärbung zu gefärbtem Protein markant verändert, kann leider mit den vorhandenen Daten nicht gesagt werden.

#### **4.2.7 Färben eines Blots mit den Modellproteinen** (siehe 2.2.11 und 3.1.6)

Der Versuch zeigt, daß sich die Färbung prinzipiell für Realproben anwenden läßt. Weder SDS noch andere Substanzen, die bei der Herstellung der Blots verwendet werden und die eine Störung der Färbung verursachen könnten (siehe 4.2.2), stellen bei dem durchgeführten Vorgehen ein grundsätzliches Problem dar. Diese Erkenntnis wurde von späteren Versuchen, bei denen 2D-Gel-Blots gefärbt wurden (siehe 4.2.10), bestätigt. Die Ursache für die starke Hintergrundfärbung an einigen Stellen ist nicht bekannt. Möglicherweise hätte weiteres gründliches Waschen das Bild verbessert.

Glucoseoxidase (63kDa) in Spur 4 und 10 ist nicht zu sehen. Das wäre möglicherweise der Fall gewesen, wenn der Hintergrund gleichmäßig niedrig geblieben wäre. Die Vorversuche hatten gezeigt, daß Glucoseoxidase auch nach Vorbehandlung mit EDC/Ethylendiamin noch markiert wird (siehe 4.2.2 und 4.2.4).

#### 4.2.8 Kapillarelektrophorese (siehe 2.3 und 3.2)

Bei der Betrachtung von Abb. 3.7 stellt sich die Frage, warum welche Komponente wie schnell gewandert ist und warum nicht nur ein Peak je Komponente zu sehen ist. Bei pH 6 ist mit dem elektroosmotischen Fluß (EOF siehe 2.1.1.2) als treibender Kraft zu rechnen. Weitere entscheidende Größen für die Wanderungsgeschwindigkeit sind die Gesamtladung und die Molekülgröße.

Bei pH 6 ist FIF neutral, da der Fluoresceinanteil und der Iminodiessigsäureanteil bei diesem pH-Wert zusammen drei deprotonierte Carboxylgruppen aufweisen, die durch das Fe(III) insgesamt ausgeglichen werden. Glucoseoxidase und Ovalbumin haben Molekulargewichte von 63 und 43 kDa und theoretische pI-Werte von 4,9 bzw. 5,2. Damit weisen sie bei pH 6,0 eine negative Gesamtladung auf. An die Kapillare wird die Spannung derart angelegt, daß die Anode am Injektionsende liegt. Der EOF ist allerdings in Richtung Kathode gerichtet und so ist erklärlich, daß die nachzuweisenden Substanzen entgegen ihrer Gesamtladung zum Detektionsfenster wandern.

FIF als das kleinste Molekül ist ungeladen und erreicht deshalb als erstes das kathodische Kapillarende. Glucoseoxidase wird vermutlich deshalb früher detektiert als Ovalbumin, weil es bei pH 6 mehr negative Ladungen trägt. Die Größe der Proteine scheint hier also nicht entscheidend zu sein.

Der Doppelpeak von FIF wäre erklärbar, wenn FIF Dimere bildet (siehe auch 4.1). Diese hätten die doppelte Masse der Monomere und ihre Ladungen wären nach außen nicht frei zugänglich.

Beide Proteine dürften in der Lage sein, mehrere FIF-Moleküle zu binden. Das ist eine mögliche Erklärung dafür, daß nicht jeweils ein scharfer Peak entsteht. Der größte Anteil des markierten Ovalbumin ist aber offenbar maximal beladen. Daß Proteine nicht exakt einheitlich, sondern in Isoformen vorliegen, z.B. durch verschiedene Glykosylierungsgrade und / oder -formen und / oder verschiedene Phosphorylierungsgrade, untersuchten unter anderem Packer-NH und ihre Mitarbeiter 1997. Die vielen Glykosylierungsformen von Ovalbumin beobachteten auch Wilm-M und Mann-M 1996 mit Hilfe der Nanospray Ion Source Massenspektrometrie. Wenn die Auflösung der Kapillarelektrophoresemethode nicht hoch genug war, diese Isoformen zu trennen, kann das zu dem erhaltenen Erscheinungsbild eines mehr oder weniger breiten Peaks geführt haben. Zudem können die Proteine bei pH 6 an der Kapillarwand anhaften und damit die Peaks nach hinten verlängert werden.



#### 4.2.9 *Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel* (siehe 2.6.3 und 3.4.2)

Bei dem Experiment zeigten sich drei verschiedene, radioaktiv markierte Banden in den IL-1RI-Proben. Sie konnten entweder aus der Phosphorylierung eines Proteins durch eine Kinase oder der festen Bindung von ATP an ein Protein resultieren.

Die Tatsache, daß die Stimulierung mit IL-1 eine Signalerhöhung mit sich bringt, kann ebenfalls mit zwei verschiedenen Vorgängen erklärt werden. Entweder wird das entsprechende Protein nach IL-1-Bindung vermehrt an den Rezeptor rekrutiert, oder es ist bereits gebunden und wird stimuliert. Weiterhin läßt sich aus dem Ergebnis des Versuches schließen, daß, wenn es sich um Kinasen handelt, diese sich selbst phosphorylieren können (Autophosphorylierung), wenn nicht zufällig Kinasen und Substrate übereinander liegen.

Zuletzt läßt sich der Unterschied der Bandenintensitäten in den verschiedenen Gelen interpretieren, der bei der nicht stimulierten Probe besonders deutlich wird. Wenn zusätzliches Substrat im Gel ist, sind die Bereiche der beiden größeren Proteine etwa gleich stark radioaktiv, ohne Zusatz wird die Bande des kleineren der beiden klar stärker markiert. Dies läßt sich erklären, wenn man davon ausgeht, daß eine unterschiedlich starke Autophosphorylierbarkeit oder -geschwindigkeit vorliegt, die durch ein zusätzliches Substrat so überlagert wird, daß die Gesamtphosphorylierung gleich hoch ist (in dem Fall ist die größere Kinase möglicherweise an dem zusätzlichen Substrat aktiver als die kleinere). Handelte es sich nur um ATP-bindende Proteine, wäre der Unterschied in den beiden Gelen nicht oder nur schwer erklärbar.

Martin-M und Mitarbeiter zeigten 1994, daß ein Protein der Größenordnung von 60kDa, also der kleinsten der drei hier erhaltenen Banden entsprechend, bei einem Kinaseassay mit dem Immunopräzipitat des IL-1RI (in der vorliegenden Arbeit wurde in enger Anlehnung an das Versuchsprotokoll und mit dem gleichen Antikörper gearbeitet) radioaktiv markiert wird und anschließend im SDS-Gel zu erkennen ist. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um das gleiche Protein handelt. Die Gruppe um Martin-M stellte fest, daß es nach IL-1-Stimulierung in deutlich verstärktem Maße Serin/Threonin-spezifisch phosphoryliert wird. Es konnte vom Rezeptorkomplex noch nicht isoliert und identifiziert werden. In den Abbildungen (Martin-M et al. 1994) ist darüber hinaus zu erkennen, daß im höhermolekularen Bereich ebenfalls Radioaktivität, wenngleich deutlich schwächer, detektiert wird. 1996 beschrieben Cao-Z et al. die IL-1RI assoziierte Kinase (IRAK) aus dem Rezeptorkomplex, eine Serin/Threonin-spezifische Kinase. 1997 fanden Muzio-M und seine Mitarbeiter noch eine zweite, der IRAK verwandte und deshalb IRAK-2 genannte Kinase, und schließlich isolierten Wesche-H und seine Mitarbeiter 1999 auch noch IRAK-M, ebenfalls ein Mitglied

der IRAK-Familie. Die drei Kinasen assoziieren mit dem Rezeptor nach Stimulation mit IL-1 und könnten deshalb in der aufgearbeiteten Probe zu finden sein. Ihr Molekulargewicht beträgt etwa 80-110kDa (IRAK je nach Phosphorylierungsgrad (Böl-GF et al. 2000)), 65kDa (IRAK2) und 68kDa (IRAK-M). Die Entdecker von IRAK-M stellten allerdings fest, daß sie offenbar nicht wie IRAK und IRAK-2 in T-Zellen exprimiert wird. IRAK kann wie die anderen IRAK-Formen wohl auch autophosphorylieren. Bei ihnen ist eine schwache Autophosphorylierung zu beobachten, die vermutlich nach Aktivierung, vielleicht durch IRAK, verstärkt wird. Im vorliegenden Fall kann angenommen werden, daß IRAK und IRAK-2 im Gel vorhanden sind. Bei der Bande um 90kDa kann davon ausgegangen werden, daß es sich um IRAK handelt. Die nach den Gelbildern vorgenommene Größenbestimmung ist nicht exakt. Mit etwa 65kDa liegt die IRAK2 durchaus im Fehlerbereich der 60kDa-Bande, könnte ihr also entsprechen. Bei dem schlechten Auflösungsvermögen im Größenbereich oberhalb von 70-80kDa läßt sich darüber hinaus mutmaßen, daß die auf 120kDa geschätzte Bande der stärker phosphorylierten Form der IRAK entspricht. Diese These wird dadurch gestützt, daß sie in dem Gel ohne zusätzliches Kinasesubstrat weniger deutlich zu sehen ist. Liegt sie bereits hoch phosphoryliert vor, kann nur wenig weiteres Phosphat eingebaut werden, außer wenn zusätzliches Substrat verfügbar ist, wie in Gel A (siehe Abb. 3.11).

Weitere Proteine könnten für die gefundenen Banden in Frage kommen. Das von Sacht-G und Mitarbeitern 1999 am Rezeptorkomplex beobachtete Mortalin 3 (mot-3, siehe auch 1.2.4) liegt mit einer Größe von 74kDa zwischen den Größen der beobachteten Banden. Daß bei 74kDa keine radioaktiv markierte Bande auftaucht, kann mit den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese erklärt werden, denn nicht alle Proteine lassen sich mit der angewendeten Methode regenerieren. Möglicherweise ist Mortalin unter diesen Bedingungen nicht mehr in der Lage, ATP zu binden.

Als wichtigster Schluß des Experiments läßt sich folgern, daß es sich bei dem von Martin-M und Mitarbeitern beschriebenen 60kDa-Substrat um eine Kinase handelt, möglicherweise IRAK-2, die autophosphoryliert.

Unter den verwendeten Versuchsbedingungen liegen mindestens zwei aktive Kinasen an den Rezeptor gebunden vor. Das Immunopräzipitat des IL-1RI war also theoretisch als Modellsystem für das Testen der FIF-Markierung geeignet.

#### 4.2.10 Erstellen und Färben von 2D-Gelen und -Blots

(Siehe 2.7 und 3.5)

Die verschiedenen Färbungen von 2D-Blots bzw. -Gelen mit verschiedenen behandelten EL-4-Zellen lieferten wenig aussagekräftige Ergebnisse, verdeutlichten aber einige Probleme der Methoden. Es zeigte sich, daß (1) eine Färbung mit FIF mit einer zumindest für zahlreiche Proteine ausreichenden Empfindlichkeit gelingt und daß (2) die Färbung nicht einfach einer Proteinfärbung entspricht. Da praktisch keine Daten über die Proteine im 2D-Proteinbild von EL-4-Zellen zur Verfügung stehen, können hier aber keine Schlüsse über die Spezifität der Färbung gezogen werden. Das war später mit Hilfe der Färbung von Peptiden möglich (siehe 4.2.13).

Die Firma Pierce gibt in ihrer Vorschrift für die Anwendung von INDIA<sup>TM</sup> PhosphoProbe-HRP an, daß ihr Marker bei Proteinen nur dann eine hohe Spezifität erreicht, wenn diese mit EDC/Ethylendiamin vorbehandelt werden. Die meisten der von ihnen untersuchten Proteine hätten ohne diese Vorbehandlung eine gewisse Affinität zum Marker gezeigt, gleichgültig, ob eine Phosphorylierung vorlag. Da die Blots nicht vorbehandelt worden waren, ist also davon auszugehen, daß in dem EL-4-Lysat die meisten Proteine, auch nicht phosphorylierte, markiert waren. Die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchung mittels Peptiden bestätigten später ebenfalls, daß FIF nicht ausschließlich Phosphoaminosäuren markiert (siehe 4.2.13).

Der Vergleich der FIF-Färbung mit der mit indischer Tinte (eine Gesamtproteinfärbung) im Detail (siehe Abb. 3.12 C, B und 3.13) zeigte, daß bestimmte Spots mal mit der einen, mal mit der anderen Methode besser gefärbt wurden. Dies spricht sowohl für die Empfindlichkeit als auch dafür, daß FIF auch ohne Vorbehandlung zwar vermutlich die meisten, aber zumindest nicht alle Proteine bindet.

Abb. 3.12 (D) läßt deutlich erkennen, daß die Aufnahmen mit der CCD-Kamera schlechterer Qualität sind, als die mit dem PC-Scanner eingescannten Bilder (Abb. 3.12 B), was ein genereller Nachteil der Fluoreszenzdetektion ist. Die Verwendung besserer Bilderfassungsmethoden sollte die Empfindlichkeit der Färbemethode erhöhen. Vergleicht man des weiteren die Detektion bei pH 9 und pH 6 (Abb. 3.12 C und A), so läßt sich erkennen, wie wertvoll die Verbesserung der Detektionsmethode entweder durch Verwendung eines anderen Fluoreszenzmarkers oder durch Verbesserung der Technik der pH-Wert-Erhöhung ohne Auswaschen des FIF sein könnte.

Ein generelles Problem, das beim Blotten auftritt, zeigt Abb. 6.2 B. Das Gel, aus dem die Proteine auf die Membran geblottet wurden, weist nach langer Entwicklungszeit noch zahlreiche Proteinspots, insbesondere im basischeren und höhermolekularen Bereich, auf. Auch beim Vergleich der radioaktiven Muster eines Blots (Abb. 6.2 A) und des zugehörigen Gels (nach dem Blot) (Abb. 6.2 B) wird deutlich, daß die Methode ggf. schwerwiegende Proteinverluste mit sich bringt. Obgleich sich die Blotmethode

verbessern läßt, ist sie immer mit Fehlern behaftet, da der Übergang der Proteine aus dem Gel auf die Membran von der Löslichkeit der jeweiligen Proteine im Blotpuffer, der Größe der Proteine, deren Ladung und ihrer Haftung an der Membran abhängig ist. Dadurch wird das Proteinmuster nicht berechenbar und möglicherweise stark verändert. Ein Handhabungsfehler entsteht zusätzlich, da der Kontakt der Blotschichten (Saugpapiere, Gel, Membran und Elektroden) möglicherweise nicht ständig gewährleistet ist, da es durch die Wärmefreisetzung zur Gasentwicklung kommt. Die resultierenden Gasblasen können den Kontakt zwischen den Schichten und damit den Proteintransfer behindern (Lottspeich-F und Zorbas-H 1999).

Damit sind Nachweistechiken von mit Gelelektrophorese getrennten Proteinen, die ein Blotten bedingen, wie Antikörpermarkierungen oder die FIF-Färbung, im Nachteil gegenüber Methoden, bei denen nicht geblottet werden muß.

Im vorliegenden Fall waren die Fehler im Verhältnis zur Zahl der Proben insgesamt zu groß, um Aussagen über Unterschiede im Muster der Proteine vor und nach der Stimulierung mit IL-1 treffen zu können, die dann eventuell im FIF-Färbemuster wiederzufinden wären. Auch die radioaktiv markierten Blots waren so nicht verläßlich auswertbar. Ein Vergleich mit der Markierung mit FIF scheiterte außerdem, da die radioaktiven Spots nicht exakt der Gesamtproteinfärbung zuzuordnen waren und da, wie hier, bei einer Pulsmarkierung nur im Zeitraum der radioaktiven Phosphatgabe phosphorylierte Proteine zu sehen sind und nicht, wie bei FIF erwartet, alle Phosphoproteine.

#### ***4.2.11 Kinaseaktivität von Immunopräzipitat auf Blot- und Peptidmembranen***

Die Methode der Verwendung von Immunopräzipitat für enzymatische Assays auf Peptidmembranen und Blots ist in der Literatur nicht beschrieben. Daher soll hier ihre Anwendbarkeit auch generell diskutiert werden.

An Sepharosebeads oder Membranen immobilisierte Enzyme und Substrate sind in ihrer Beweglichkeit und Zugänglichkeit eingeschränkt. Deshalb ist es von Vorteil, wenn entweder die Substrate oder die Enzyme in Lösung vorliegen und damit frei diffundieren können. Das Experiment zeigt, daß auch an Beads immobilisierte Enzyme beweglich genug sein können, an Membranen immobilisierte Substrate umzusetzen. Damit stellt die Methode eine Möglichkeit dar, mit Kinasen oder anderen Enzymen zu arbeiten, die beispielsweise nur indirekt über ein Immunopräzipitat teilaufgereinigt werden können und

mit Substraten, die nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehen oder von denen man eine große Vielfalt testen möchte.

Die Methode kann eingesetzt werden, um Folgeschritte in einer Reaktionskette zu finden, wie beispielsweise im durchgeführten Experiment mit EL-4-Gesamtlysat auf Blots gezeigt (siehe Abb. 3.14 A), oder Enzymspezifitätstests durchzuführen, wie mit den Peptidsubstratmembranen demonstriert (siehe Abb. 3.15 A).

Im vorliegenden Fall war neben IRAK die Aktivität einer noch nicht identifizierten Kinase im IL-1 Rezeptorkomplex bekannt, möglicherweise IRAK-2 (siehe 1.2.4). Interessant sind in diesem Zusammenhang zum einen die Substratspezifität, die sich durch Gabe zahlreicher, verschiedener Peptidsequenzen untersuchen läßt. Sie kann der Identifizierung der Kinase dienen, ist aber zur Charakterisierung in jedem Fall interessant, auch um beispielsweise einen spezifischen Nachweis für die Aktivität der Kinase etablieren zu können. Zum anderen besteht prinzipiell die Möglichkeit, natürliche Substrate der Kinase zu finden, indem mit einem 2D-Gel-Blot vom Proteom (siehe dazu 1.2.1), also dem Proteinmuster der Zelllinie, aus der das Enzym isoliert wurde, ein entsprechender Assay durchgeführt wird. Damit könnten Signalwege aufgeklärt werden, in die die Kinase eingebunden ist.

Wie die Versuche zeigen, können die im Experiment verwendeten Kinasen Substrate auf den Peptidmembranen und der Blotmembran phosphorylieren. Um den natürlichen Bedingungen etwas näher zu kommen, d.h. um nicht beliebig denaturierte und damit offene Peptidstränge darzubieten, sondern möglichst in vivo relevante spezifische Strukturen, wurden die Proteine auf dem Blot vor dem Assay einer Renaturierungsbehandlung unterzogen. Mit einer sehr ähnlichen Regenerierungsmethode ließen sich auch autophosphorylierende Kinasen regenerieren (Celenza-JL und Carlson-M 1986, Roussou-I et al. 1988). Daß im Referenzblot keine Radioaktivspots zu sehen waren (siehe Abb. 3.14 B), zeigte, daß im vorliegenden Fall keine Autophosphorylierungen auftraten.

Da die Zahl der phosphorylierten Proteine auf dem Blot nicht allzu hoch war, wäre es durchaus interessant gewesen, diese zu identifizieren. Leider gelang dies nicht (s.u.). Bei der trotz des Vorhandenseins mehrerer Kinasen überschaubaren Anzahl markierter Spots wäre durchaus mit nur wenigen unspezifischen Signalen zu rechnen gewesen.

Die einzigen Spots auf dem Blot, die sich theoretisch ableiten lassen, sind die Kinasen aus dem Immunopräzipitat. Da sie autophosphorylieren (siehe 1.2.4), kann davon ausgegangen werden, daß sie auch im Gesamtlysatblot markiert zu finden sind. Über ihre Gelpositionen liegen wenige ungenaue Daten vor. Verfügbar sind die aus der Aminosäuresequenz berechneten pI- und Molekulargewichtswerte, die aber in vivo aufgrund von posttranslationalen Modifikationen deutlich abweichen (siehe auch 1.2.4), sowie die aus dem Gelregenerierungsexperiment abgeschätzten Größen von 60, 90 und 120 kDa (siehe 3.1.6). Da zudem keine Größenstandards verwendet wurden, gelang keine Zuordnung.

Eine Identifizierung von weiteren phosphorylierten Proteinen auf dem Blot oder auch nur die Bestimmung ihre Position relativ zu anderen Proteinen war aus Material- und Zeitmangel nicht mehr möglich. Eine Gesamtproteinfärbung der verwendeten Membranen scheiterte am Blocken des Blots mit BSA, das eine solche Färbung erschwert. Das Radioaktivmuster gibt keine exakten Hinweise auf die Gelpositionen einzelner Proteine, die eine Identifizierung eventuell ermöglicht hätten, da es mit dem Gesamtproteinmuster anderer EL-4-Lysat-2D-Gele nicht ausreichend korreliert. Radioaktivspots können in ihrer Quantität stark von einer Proteinfärbung abweichen und im Extremfall ausschließlich im Radioaktivitätsabbild zu sehen sein.

Eine mögliche Lösung für das Problem der Identifizierung könnte der Einsatz von spezifischen Antikörpern sein. Diese könnten bekannte Proteine als Positionsmarker detektieren, sofern Proteine gefunden werden können, die nach der Renaturierungsbehandlung und dem Abwaschen des überschüssigen radioaktiven Phosphates noch nachweisbar sind. Da sich Proteine aus einem mit Protein geblockten Blot nicht mehr ansequenzieren lassen, wäre jeweils ein parallel erstelltes Gel notwendig, bei dem dann relevante Proteinspots zur weiteren Untersuchung ausgestochen werden könnten. Die Zunahme der Daten, die in Proteom-Datenbanken zur Verfügung stehen, wird die Identifizierung von mit dieser Methode gefundenen Substraten erleichtern. Zu bedenken ist dabei, daß die markierten Proteine die Spotposition ihrer nicht oder nur teilweise phosphorylierten Form besetzen, da sie erst nach der Erstellung des Geles phosphoryliert oder vollständig phosphoryliert werden. Ein grundsätzliches Problem der Identifizierung radioaktiv markierter Proteine ist, daß diese eventuell in zu geringen Mengen vorliegen, obwohl sie im Radioaktivabbild zu sehen sind. Hier lassen sich manchmal die Ausbeuten aus mehreren Gelen vereinigen.

Bei der untersuchten Probe handelt es sich um Gesamtlysat, d.h. die Zellmembranen wurden aufgeschlossen. Dadurch sind auch Proteine auf dem Blot, die in vivo für die Kinasen möglicherweise nicht zugänglich sind, weil sie ausschließlich in Zellkompartimenten, wie Mitochondrien oder dem

Zellkern vorkommen. Außerdem ist davon auszugehen, daß nicht alle Proteine regeneriert worden sind, so daß Sequenzen phosphoryliert werden konnten, die beim nativen Protein unzugänglich sind.

Die Auswertung der radioaktiv markierten Peptide auf den Peptidmembranen zeigt, daß die Kinasen aus dem Immunpräzipitat eine gewisse Bevorzugung von Serin gegenüber Tyrosin aufweisen, das allerdings ebenfalls bei einigen Sequenzen phosphoryliert wird. Da einige Sequenzen auch ohne Kinasezugabe eine leichte Markierung mit radioaktivem Phosphat aufweisen, könnten sie relativ unspezifisch phosphoryliert worden sein. Martin-M und seine Mitarbeiter führten 1994 zusätzlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll für die Immunopräzipitation noch ein sogenanntes Preclearing durch, bei dem Sepharosebeads und unspezifische Antikörper solche Proteine abtrennen sollen, die unspezifisch binden. Dennoch fanden sie Verunreinigungen des Immunopräzipitats durch Kinasen. Es ist anzunehmen, daß bei dem hier verwendeten Protokoll noch mehr solcher Artefakte zu finden sind. Diese dürften neben den erwarteten Signalen der IRAKs (siehe 1.2.4), die zu den Serin-/Threonin-spezifischen Kinasen gehören, auch für einen unspezifischen Hintergrund sorgen.

#### ***4.2.12 Färben von Kinasesubstratpeptiden auf Membranen mit FIF und INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP*** (Siehe 2.8.2 und 3.6.2)

Das Färben der Peptidmembranen mit FIF fiel gleich aus, gleichgültig, ob die Peptide phosphoryliert waren oder nicht. Ein möglicher Grund für diese Übereinstimmung im Färbemuster war die leichte Phosphorylierung, die auch ohne Kinasen zustande kommt.

Die drei schwach zu sehenden Spots (Nummer 2, 4 und 5) sind auch diejenigen, die bei Kinasezugabe am deutlichsten markiert werden. Eine genauere Betrachtung der Sequenzen deutet aber bereits die entscheidende Erklärung an. Nummer 5 trägt 7 positive Ladungen, Nummer 1 und 2 tragen je 4, Nummer 3 und 4 je 3, Nummer 7, 12 und 13 je eine und die anderen gar keine. Die FIF-markierten Peptide sind also diejenigen mit den meisten positiven Ladungen (Peptid Nummer 1 und 5 vor 2, 3 und 4). Die negativen Ladungen durch die Phosphorylierung scheinen dabei keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Membran, die ohne Immunopräzipitat inkubiert worden war, sich im Ergebnis nicht von den anderen unterscheidet. Daß die Fluoreszenzintensität durch positive Ladungen verstärkt werden dürfte, ist in der einführenden Theorie (siehe 4.1) dargelegt worden. Daß aber diese Peptide überhaupt gebunden werden, war so nicht zu erwarten. Die Ursache dafür liegt bei den falschen Lagerungsbedingungen des Farbstoffes. Welche Faktoren (z.B. Temperatur und Zeit) in

welcher Weise auf den Farbstoff wirken, ist nicht bekannt. Der direkte Vergleich mit der Färbung mit frisch angesetzter FIF-Lösung bestätigte aber bei der Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen (siehe 2.9, 3.7 und 4.2.13) die Vermutung, daß der Farbstoff sich unter den gewählten Lagerungsbedingungen verändert, da das Färbemuster dann anders und eher den Erwartungen entsprechend ausfiel. Auch hier war zuvor überlagertes FIF verwendet worden und dies hatte bevorzugt an Aminogruppen reiche Peptide markiert (Ergebnis nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, daß der aufgrund der noch vorhandenen Fluoreszenz offenbar nicht beeinträchtigte Fluoresceinanteil einen Teil der Bindung ausmachte. Darüber hinaus läßt sich vermuten, daß die positiven Ladungen der Peptide nicht nur Einfluß auf die Fluoreszenzintensität nehmen, sondern auch einen Teil der FIF-Moleküle binden. Erklärbar wäre dies durch die Annahme, daß das Fe(III) aus dem IDA-Komplex verloren geht. Die dadurch frei werdenden Carboxylgruppen des IDA könnten dann die positiv geladenen Gruppen binden.

Das Experiment zeigt, daß FIF als DMSO-Stammlösung unbeschadet nicht länger als einige Tage bis Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Bei -20°C liegt die Lagerstabilität im Bereich weniger Monate (Gast-R persönliche Mitteilung).

Die Färbung mit INDIA<sup>TM</sup>-Phosphoprobe-HRP fiel ebenfalls unerwartet aus. Nahezu alle Spots sind gut gefärbt, ein Unterschied zwischen phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptiden ist nicht zu erkennen. Da die Peptide mit EDC/Ethylendiamin vorbehandelt worden waren (siehe 2.1.2.2 und 2.2.5), sind auch modifizierte Glutamate zu erwarten. Diese sollten jetzt Amino- statt Carboxylgruppen tragen. Vermutlich war auch dieser Marker überlagert und hatte dabei, wie bei FIF auch vermutet, das Fe(III) verloren. Das ist denkbar wenngleich unerwartet, da er kurz vor dem von Pierce angegebenen Ablaufdatum stand. Für den Fall könnte die nicht quantitativ abgelaufene chemische Reaktion und möglicherweise zudem die negativen Ladungen der Phosphatgruppen dafür verantwortlich sein, daß das Resultat direkt kein System für die Bindung erkennen ließ.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß beide Chelatoren bei zu langer Lagerung das Fe(III) verlieren und sich dann wie Anionentauscher verhalten.



#### **4.2.13 Untersuchung der Spezifität der Färbung mittels Peptidmembranen**

(siehe 2.9 und 3.7)

##### **4.2.13.1 Peptidmembranen und Peptid Auswahl**

Das Format der Membranen beschränkt die Zahl der Peptide auf 425. Die Länge der Peptide wurde mit 7 Aminosäuren gewählt, um einerseits ausreichende Variationsmöglichkeiten zu erhalten und andererseits die Synthesezeit in Grenzen zu halten.

Die Auswahl der Peptidsequenzen wurde unter folgenden Gesichtspunkten getroffen:

1. Es wurden zwei sich entsprechende Peptidmembranen hergestellt, von denen eine in allen Peptiden jeweils eine Phosphoaminosäure enthielt, die andere die entsprechende nicht phosphorylierte Form der Aminosäure.
2. Um festzustellen, ob die Position bestimmter Aminosäuren relativ zur Phosphoaminosäure im Peptid eine Rolle spielt, wurden deren Positionen variiert.
3. Von jeder Sequenzvariante wurde eine mit Phosphoserin, eine mit Phosphothreonin und eine mit Phosphotyrosin bzw. den entsprechenden nicht phosphorylierten Aminosäuren gewählt.
4. Aufgrund der Annahme von Muszynska-G et al. (1992), daß Carboxylgruppen mit Fe(III)-IDA wechselwirken können, wurden Peptide mit Glutamat und als ungeladene Gegenprobe die entsprechenden Glutaminpeptide ausgewählt.
5. Muszynska-G et al. nahmen weiter an, daß die Bindung von Glutamat an das Chelat insbesondere in Kombination mit Phenylresten stabil ist. Deshalb wurden Tyrosin und Phenylalanin sowohl kombiniert mit Glutamat und Glutamin als auch einzeln getestet.
6. Um den Einfluß von Ladungen zu testen, wurden neben Glutamat auch Arginin und Lysin in diversen Kombinationen eingesetzt.
7. Kleinere, ungeladene Aminosäuren wurden im wesentlichen zum Füllen verbleibender Positionen in den Peptiden verwendet.
8. Von den Aminosäuren, die nicht als primär bedeutend für die Bindung von FIF angesehen wurden, wurden nur einzelne wenige Peptide hergestellt.
9. In der Regel wurden die Phosphoaminosäuren in der Mitte der Sequenz eingesetzt. Um festzustellen, ob ihre Position in der Sequenz eine Rolle spielt, wurden Peptide ausgewählt, bei denen die Phosphoaminosäuren am zur Membran hin befindlichen Ende positioniert waren.

#### **4.2.13.2 Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen per Software**

Für die Analyse der Ergebnisse der Färbungen von Peptidmembranen wurden zunächst die Fluoreszenzintensitätswerte der Peptide vor und nach den Färbungen wie unter 2.9 beschrieben per Software ermittelt. Für die Listen der mit FIF oder Fluorescein markierten Peptide (siehe 3.17, 3.18 und 3.20) wurden dann die Werte der Spots vor der Färbung von den Werten der entsprechenden Spots nach der Färbung abgezogen. Für die FIF-Färbung wurden alle Spots mit Intensitätswerten über 5000 angegeben. Diese frei gewählte Grenze korrelierte gut mit einer Beurteilung der Spots per Augenschein nach Kontrastierung der Aufnahmen durch eine Bildverarbeitungssoftware (Photoshop 4.0, Adobe Systems Inc.). Für die Fluoresceinfärbung und die Fluoreszenzintensität vor den Färbungen wurden erst Peptide mit Werten über 10000 aufgelistet (siehe dazu auch 4.2.13.7).

Bei dem gewählten Werterfassungsmodus (siehe unter 2.9) kann die Begrenzungskreislinie, die als Hintergrund von der Kreisfläche abgezogen wird, ungünstig liegen. Wenn sie beispielsweise einen Spot schneidet oder einen anderen Bereich mit für den Hintergrund untypisch hoher Fluoreszenzintensität, wird der ausgegebene Wert des Spots zu niedrig ausfallen. Liegt die Kreislinie dagegen in einem für den Hintergrund untypisch niedrigen Intensitätsbereich, kann das Resultat ein zu hoher Wert sein. Bei der geringen Auflösung der Aufnahmen dürften schon wenige untypische Pixelwerte zu großen Fehlern führen können. Durch die Verrechnung der Werte vor und nach einer Färbung können sich solche Fehler noch verstärken.

Aufgrund dieser Fehler und mangels paralleler Proben sind die Werte daher entsprechend vorsichtig zu betrachten. Durch die hohe Zahl der z.T. nur gering unterschiedlichen Peptide sind dennoch Aussagen über Bindungstendenzen möglich.

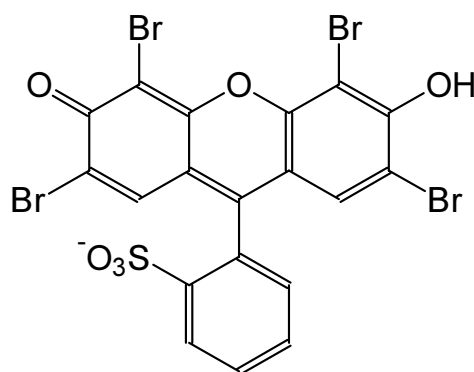
#### **4.2.13.3 Allgemeines zur Färbung der Peptidmembranen (Hintergrund und Fehler)**

Die Auswertung der intensiv fluoreszierenden Spots verdeutlichte, daß das Bindungs- und Fluoreszenzverhalten von FIF komplex ist, was nach der oben aufgestellten Theorie zum Färbeverhalten von FIF (siehe 4.1) zu erwarten war. Es zeigt sich, daß zahlreiche Phosphopeptide spezifisch markiert werden, viele jedoch auch nicht. Außerdem werden auch nicht phosphorylierte Peptide markiert, offenbar nicht nur in Abhängigkeit von bestimmten Aminosäuren. Weitere Effekte überlagern offenbar die in der Theorie postulierten. Diese Effekte sind (I) bei der schon vor der Färbung vorhandenen Fluoreszenz, (II) dem Abrieb der Membran und (III) bei der Struktur und der Beweglichkeit der beteiligten Substanzen zu suchen.

(I) Die Fluoreszenz der Spots, die schon vor der Färbung zu beobachten ist (siehe Abb. 6.4, 6.8 und 3.19), macht die Auswertung der betroffenen Peptide z.T. schwierig oder sogar unmöglich. Vor allem die quantitative Analyse wird durch sie erschwert, da nur diejenigen Intensitäten zur Geltung kommen, die über dieser Hintergrundfluoreszenz liegen.

Die Hintergrundfluoreszenz kann nicht durch die Peptide selbst verursacht werden, da diese im betroffenen Meßbereich nicht fluoreszieren. Durch eine erneute Behandlung mit Trifluoressigsäure, die zum Entfernen von Schutzgruppen eingesetzt wird, konnte sie verringert werden. Das war ein Hinweis darauf, daß sie durch an die Peptide haftende Substanzen zustande kam. Bei der Synthese der Peptide kommt Bromphenolblau (siehe Abb. 4.5) zum Einsatz, das große Ähnlichkeiten mit Fluorescein aufweist und damit für die Hintergrundfluoreszenz verantwortlich sein dürfte. Es wird zum Nachweis der jeweils zuletzt angehängten Aminosäure nach jeder Kopplung eingesetzt, da es an die endständigen Aminogruppen bindet (Tegge-W und Frank-R 1995 und Gast-R et al. 1999). Die Ähnlichkeit mit Fluorescein (siehe Abb. 4.2) ist offensichtlich, und eine Fluoreszenzmessung bei 520 nm mit einer Anregungswellenlänge von 490 nm bestätigte, daß Bromphenolblau hier fluoresziert (Ergebnis nicht gezeigt).

Eine Hintergrundfluoreszenz wurde auch von Gast-R 1999 beobachtet. Als Matrix für die Peptide dienten ihm bei den Experimenten Sepharosebeads. Bei der Synthese wurde ebenfalls Bromphenolblau als Nachweisreagenz verwendet, das für die Fluoreszenz schon vor der Färbung verantwortlich sein könnte.



Abhängigkeit der Sequenz. Die Cellulose wirkt auch augenscheinlich derart, als ob ihre gleichmäßigen Fasern durch Abrieb etwas aufgeraut worden wären. Dadurch wurden die ursprünglich kompakten Spots etwas zerfasert. Dies hat das Ergebnis der Fluoreszenzdetektion deutlich verschlechtert, die Bilder erscheinen etwas unscharf (siehe Abb. 6.5 bis 6.11).

(III) Bei einer genauen Betrachtung der in den markierten Phosphopeptiden häufig auftretenden Aminosäuren fallen Punkte auf, die strukturell bedingt sein könnten. Bei einem Teil dieser Peptide finden sich viele kleine Aminosäuren in den Sequenzen, bei einem anderen große, sich gegenseitig abstoßende aromatische Aminosäuren. Darüber hinaus wird im wesentlichen Phosphotyrosin markiert, durch das der Phosphatrest am weitesten vom Peptidrückgrat exponiert wird. Dies läßt die Vermutung zu, daß die Exponiertheit bzw. die Zugänglichkeit der Phosphatgruppen mit entscheidend für die Bindung von FIF ist (siehe auch 4.1).

Die Peptide sind mit einer Länge von nur 7 Aminosäuren sehr flexibel, wesentliche Einschränkungen in der Zugänglichkeit durch stabile dreidimensionale Strukturen sollten nicht bestehen. Stärker miteinander wechselwirkende Gruppen in einer Sequenz, wie z.B. Glutamat und Lysin, könnten allerdings Einfluß auf die Zugänglichkeit haben. Vor allem aber können positiv geladene Aminosäuren mit den Phosphatresten wechselwirken und diese dadurch für die Farbstoffbindung blockieren.

#### **4.2.13.4 Die Fluoreszenz der Peptide vor den Färbungen**

Die Sequenzen der Peptide, die schon ohne Färbung besonders intensiv fluoreszieren (siehe Abb. 3.19), weisen neben den Phosphoaminosäuren bzw. deren nicht phosphorylierten Isoformen, von denen (Phospho-) Tyrosin leicht bevorzugt wird, vermehrt Histidin, Lysin, Arginin, Tryptophan, Cystein, Tyrosin, Phenylalanin und Glutamat auf. Die hydrophoben und die basischen Aminosäuren dürften im wesentlichen für die starke Bindung des Bromphenolblau verantwortlich sein. Die protonierten Aminogruppen binden die negativ geladene Sulfogruppe des Bromphenolblau (nach Steinberg-TH et al. (2000) bindet Bromphenolblau bevorzugt Lysin und Arginin). Zudem dürften sie den pH-Wert der Mikroumgebung (siehe Abb. 4.3) erhöhen, der dann, wie bei Fluorescein, zu einer Intensivierung der Fluoreszenz führen sollte. Die hydrophoben Aminosäuren könnten Bromphenolblau über hydrophobe Wechselwirkungen binden.

Das gehäufte Auftreten von Glutamat in den am stärksten fluoreszierenden Peptiden ist scheinbar widersprüchlich, da weder eine Bindung noch eine Fluoreszenzverstärkung zu erwarten ist. Dies wird

aber dadurch relativiert, daß die Gesamtladung der Peptide maximal einfach negativ ist, also fast in allen Fällen ausgeglichen wird. Ebenso wie vermutlich im Fall von Cystein, wo Tryptophan für die Bindung verantwortlich sein dürfte, könnten die entscheidenden Aminosäuren in den betroffenen Peptiden andere sein.

Daß deutlich mehr nicht phosphorylierte Peptide markiert werden und diese auch noch intensiver fluoreszieren, dürfte auch daran liegen, daß die zusätzliche Phosphatgruppe Bromphenolblau abstößt, bzw. daß sie Aminogruppen durch ionische Wechselwirkungen mit diesen belegt. Nicht zuletzt senken die Ladungen den pH-Wert der Mikroumgebung und verringern damit die Fluoreszenzintensität.

#### 4.2.13.5 Phosphopeptide

In den mit FIF markierten Phosphopeptiden finden sich wenige mit freien Aminogruppen. Dies war nach der in dieser Arbeit aufgestellten Theorie zum Färbeverhalten von FIF (siehe 4.1) so nicht erwartet, da hier von einer Verstärkung der Fluoreszenzintensität aufgrund einer Erhöhung des pH-Wertes in der Mikroumgebung ausgegangen wird (siehe Abb. 4.1 und 4.3). Erklärbar wäre dies durch eine Wechselwirkung freier Aminogruppen mit den Phosphatresten. Die Ladungen könnten sich neutralisieren, die Zugänglichkeit des Phosphates abgeschirmt und somit eine Bindung geschwächt werden. Zudem könnte hier die abstoßende Wirkung der positiven Ladungen auf das Fe(III) ins Gewicht fallen. So würde weniger Marker gebunden und damit die Fluoreszenz weniger intensiv.

Phosphotyrosin unterscheidet sich neben dem Benzolring vor allem durch seine Größe von Phosphoserin und Phosphothreonin. Durch sie liegt der Phosphatrest vermutlich exponiert und damit für den Marker gut zugänglich vor. Dies könnte ein Grund für die bevorzugte Markierung von Phosphotyrosin sein.

Zahlreiche Sequenzen der markierten Phosphopeptide enthalten aromatische Aminosäuren. Sie könnten in den Peptiden aufgrund ihrer Größe und strukturellen Beschaffenheit ebenfalls einen Einfluß auf die Struktur der Peptide haben und damit die Zugänglichkeit der Phosphoaminosäuren verbessern. Sie sind mit ihren  $\pi$ -Systemen aber auch potentielle Liganden des Fe(III)-Chelates, da sie Elektronenpaare zur Verfügung stellen können (siehe auch 4.1). Der hydrophobe Bereich der aromatischen Aminosäuren könnte darüber hinaus mit dem entsprechenden Bereich des Fluoresceinanteils von FIF wechselwirken. Fast alle der wenigen positiv geladenen Phosphopeptide werden von FIF auch in der nicht phosphorylierten Isoform markiert. Dies deutet darauf hin, daß die Bindung unspezifisch, vermutlich

über die Carboxylgruppe des FIF an die protonierten Aminogruppen, stattfindet. Darüber hinaus dürfte sich hier die pH-Werterhöhung in der Mikroumgebung (siehe Abb. 4.3) verstärkend auf die Fluoreszenzintensivität auswirken (siehe Abb. 4.1).

#### **4.2.13.6 Nicht phosphorylierte Peptide**

Das Fehlen des Phosphatrestes, über den die wesentliche Bindung an die Peptide stattfinden soll, läßt andere Bindungseffekte in den Vordergrund treten. Die große Masse der mit FIF markierten nicht phosphorylierten Peptide trägt positive Ladungen, teilweise in Kombination mit negativen. Dabei ist die Gesamtladung meist positiv, in keinem Fall negativ. Die nicht geladenen Peptide weisen fast alle viele aromatische Aminosäuren auf.

Die Tatsache, daß von den nicht phosphorylierten Peptiden sehr viele mehr auch mit Fluorescein gefärbt werden als von den Phosphopeptiden, zeigt, daß der Fluoresceinrest hier offenbar wesentlich für die Bindung des FIF verantwortlich ist. Dieser kann über die Carboxylgruppe an protonierte Aminogruppen binden oder über den hydrophoben Bereich mit hydrophoben Aminosäuren wechselwirken. Die Aminogruppen können darüber hinaus den pH-Wert der Mikroumgebung anheben (siehe Abb. 4.3) und damit die Fluoreszenzintensität erhöhen. So kann diese, auch wenn weniger Farbstoff gebunden wurde, vergleichbar hoch sein wie bei Phosphopeptiden.

Die aromatischen Aminosäuren sollten als potentielle Liganden des Fe(III)-Chelates (siehe 4.2.13.6 und 4.1) und durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Fluoresceinanteil des FIF dieses insbesondere dann gut binden, wenn sie in einer Sequenz zahlreich vorhanden sind. Genau solche Peptide sind markiert worden.

#### **4.2.13.7 Fluoresceinfärbung der Peptide**

Ein Vergleich der Hintergrundwerte mit denen der Fluoresceinfärbung zeigt trotz der großen Ähnlichkeit der Substanzen keine hohe Übereinstimmung. Zahlreiche Peptide, die schon ohne Färbung hohe Fluoreszenzwerte aufweisen (siehe Abb. 3.19), tun dies nach Fluoresceinfärbung nicht (Abb. 3.20). Dies könnte zum einen daran liegen, daß für die Fluoresceinfärbung zuvor die Elution von FIF durchgeführt worden ist. Die Fluoreszenzintensitätswerte nach der Elution, die als Hintergrund von den Werten der Fluoresceinfärbung abgezogen werden, waren z.T. mangels ausreichender Umpufferung zu hoch ausgefallen (siehe dazu 4.2.13.9). Zum anderen könnte eine Art Sättigung einzelner Peptide

eingetreten sein, d.h. Farbstoff könnte so fest gebunden sein, daß er nicht mehr eluiert, und so eine weitere Anlagerung von Farbstoff kaum möglich ist. Dafür spricht die hohe Intensität der Fluoreszenz vor der Färbung, da die Membranen nach der Synthese der Peptide gründlich gewaschen werden (Tegge-W und Frank-R 1995). Bleibt dennoch Farbstoff zurück, wird er später nur schwer zu entfernen sein.

Im Unterschied zur Färbung mit Fluorescein ist nach der Bromphenolblaufärbung bereits eine Elution vorgenommen worden. Deshalb sind mehr Peptide mit Fluorescein markiert zu sehen als nach der Bromphenolblaubehandlung.

Die Werte der Fluoresceinfärbung und der FIF-Färbung lassen sich nicht exakt miteinander vergleichen, da die Farbstoffmengen nicht äquimolar waren. Die Fluoreszenzintensitätswerte der Peptide vor der FIF-Färbung, also dem Hintergrund der Färbung, waren quantitativ ebenfalls nicht mit denen der FIF-Färbung zu vergleichen, da bei ihnen keine Hintergrundwerte subtrahiert wurden.

Die Listen der Peptide mit hohen Fluoreszenzintensitätswerten vor der FIF-Färbung und nach der Fluoresceinfärbung wurden deshalb auf solche beschränkt, die größer als 10000 waren. In den Listen der FIF-Färbung wurden Werte ab 5000 berücksichtigt (siehe dazu auch 3.7).

Das Ergebnis der Färbung mit Fluorescein weist gegenüber der Färbung mit FIF zahlreiche Unterschiede auf. Der Grund sollte die Verschiedenheit der beiden Substanzen sein. Die durch das Fe(III)-Chelats und den Thioharnstoffanteil bewirkten Effekte sind dabei offenbar zu komplex, als daß sich darüber Aussagen machen ließen.

#### **4.2.13.8 Die Position der Phosphoaminosäure**

Der prozentuale Anteil der Sequenzen mit randständigen Phosphoaminosäuren, der markiert wird, weicht mit etwa 10 % nicht von dem Anteil an diesen Sequenzen an der Gesamtzahl der Peptide ab. Vermutlich sind die Peptide so flexibel, daß die Position tatsächlich keine entscheidende Rolle spielt, jedoch ist dies mit den vorliegenden Ergebnissen nicht verlässlich zu beurteilen.

#### **4.2.13.9 Elution des FIF von den Peptidmembranen**

Die Peptidmembranen waren in einem ersten Versuch (nicht gezeigt) mit überlagertem FIF gefärbt worden. Zur Entfernung des dabei gebundenen FIF wurden sie mit 0,5M Phosphatpuffer pH 8,0 gewaschen. Das Ergebnis dieser Abtrennung gibt nicht exakt wieder, wie gut eine Abtrennung von FIF mit dieser Vorgehensweise gelingt, weil das gebundene FIF nicht mehr die gleichen Bindungseigenschaften besessen hatte wie unbeschadetes FIF.

Ein Vergleich der Werte der Hintergrundfluoreszenzen vor der Färbung mit FIF und der mit Fluorescein zeigt zwei Effekte. Die Fluoreszenz der Spots ist, bis auf wenige Peptide, nach dem Waschen mehr angeglichen. Insgesamt sind allerdings höhere Werte zu verzeichnen als vor der ersten Färbung. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß das gründliche Spülen mit deionisiertem Wasser sowie das anschließende Äquilibrieren im 50mM MES-Puffer nicht ausgereicht haben, den pH-Wert vollständig neu einzustellen. Somit wäre die Detektion bei einem höheren pH-Wert erfolgt, der die Fluoreszenzintensität verstärkt hätte.

Die Zugabe von Fluorescein zur Färbung der Membranen nach der eigentlichen Elution mit Phosphatpuffer pH 8 könnte dazu geführt haben, daß weiteres FIF eluiert wurde, sofern zumindest ein Teil der Bindung durch den Fluoresceinanteil verursacht worden war. Dabei muß das FIF nicht unbedingt durch Fluorescein ersetzt worden sein. Wenn Fluorescein im Überschuß zugegeben wird, im Endeffekt aber weniger gut an die betroffenen Peptide bindet, wird es möglicherweise bei den Waschschritten vor der Detektion entfernt. Dieser Effekt könnte erklären, warum einige Spots nach der Färbung mit Fluorescein weniger intensiv fluoreszieren als vorher.

#### **4.2.13.10 Detektion bei einem höheren pH-Wert**

Bei einem ersten Färbeversuch wurde die Detektion bei pH 7,75 durchgeführt, um die Fluoreszenz des FIF zu verstärken (Ergebnis nicht gezeigt). Dazu wurden die gefärbten Membranen für die Aufnahmen mit der Kamera behutsam auf einige Milliliter 50mM MOPS-Puffer pH 7,75 gelegt, so daß sie gerade benetzt waren. Das resultierende Bild zeigte aber, daß auch mit dieser vorsichtigen Vorgehensweise bereits FIF abgelöst wird und diffundiert. Einzelne Bereiche der Membran wurden dadurch unscharf fluoreszierend und das Gesamtbild schlecht auswertbar. Die gezeigten Ergebnisse (Abb. 6.4 bis 6.8) entsprachen deshalb einer Detektion bei pH 6,0.



#### 4.2.13.11 Unterschiede der Peptide zu Proteinen

Ein wesentlicher Unterschied der Peptide zu Proteinen ist, daß bei den Peptiden auf engstem Raum eine kurze Sequenz vorliegt. Selbst bei immobilisierten kleinen Proteinen kommen statistisch gesehen gleiche Sequenzen nur sehr selten in räumliche Nähe. Darüber hinaus sind bei Proteinen die hydrophoben Bereiche in der Regel nach innen gewandt und damit für eine Bindung nicht zugänglich. Da sie aber einen wesentlichen Anteil an der unspezifischen Bindung an FIF haben, verringert sich das Problem einer unspezifischen Markierung bei Proteinen. Wenn die Proteine allerdings denaturiert vorliegen wie beispielsweise nach einer SDS-Gelelektrophorese oder nach Blotten, können auch die hydrophoben Bereiche zugänglich sein.

Das vermehrte Auftreten von Phosphotyrosin in den markierten Peptiden läßt nicht zwangsläufig nur Phosphotyrosin als färbbare Aminosäure zu. Die Zugänglichkeit des Phosphatrestes könnte ein entscheidendes Kriterium sein (siehe 4.2.13.3 und 4.2.13.5). Diese könnte bei einer in vivo phosphorylierten Aminosäure in einem Protein generell besser sein als in chemisch synthetisierten und kurzen Peptiden, da die enzymatische Phosphorylierung voraussetzt, daß die Aminosäure für die Kinase zugänglich ist. Die Zugänglichkeit bei einem kurzen Peptid kann deshalb schlechter sein als bei einem Protein, weil sowohl sequenzintern als auch zwischen zwei Peptiden Wechselwirkungen vor allem zwischen Amino- und Phosphatgruppen leicht stattfinden können. Im Protein sind die Strukturen weniger flexibel, und wenn Aminosäuren enzymatisch phosphorylierbar sind, sollten sie entsprechend zugänglich in der Tertiärstruktur eingepaßt vorliegen.

### 4.3 Die Verwendbarkeit von FIF und mögliche Verbesserungen

#### 4.3.1 *Die Verwendbarkeit von FIF für die Färbung von an Membranen immobilisierten Peptiden oder Proteinen*

FIF läßt sich für die Detektion von an Nitrocellulose- oder Cellulosemembranen immobilisierten phosphorylierten Peptiden oder Proteinen grundsätzlich einsetzen. Die Färbung selbst ist einfach, schnell und im Prinzip preiswert. Dennoch sind Nachteile zu bedenken:

- Die unzureichende Spezifität der Markierung mit FIF schränkt eine Anwendung ein. Ein verlässlicher Einsatz ist nur möglich, wenn festgestellt wurde, daß die zu detektierenden Proteine

- oder Peptide sich ausreichend gut bzw. spezifisch färben lassen und ihre Konzentrationen bekannt sind. Dies läßt die Färbung nur für Routineanalysen sinnvoll erscheinen, die diesen Kriterien entsprechen. Vor allem für Peptidmembranen für Kinase- oder Phosphataseassays ist sie dann aber durchaus eine Alternative zu etablierten Phosphorylierungsnachweisen, wie der Markierung mit radioaktivem Phosphor oder spezifischen Antikörpern (siehe dazu auch 1.2.3).
- Um Proteine mit FIF anfärben zu können, müssen sie, in der Regel durch Blotten, an Nitrocellulosemembranen immobilisiert werden. Daraus resultieren methodisch bedingte Fehler (siehe 4.2.11).

Die Behandlung mit EDC/Ethylendiamin vor der Färbung mit FIF (siehe 2.1.2.2, 2.2.5 und 4.1) verbessert die Fluoreszenzintensität und kann möglicherweise die Spezifität erhöhen. Dafür müßte aber ggf. noch die Reaktionszeit optimiert werden. Es bleibt allerdings fraglich, ob die Erhöhung der Spezifität der FIF-Bindung ausreichend ist, um den zusätzlichen, zeitaufwendigen Arbeitsschritt zu rechtfertigen.

Die Detektion der mit FIF markierten Peptide oder Proteine bietet weitere Ansatzpunkte zur Optimierung der Methode. Die Bildqualität der Fluoreszenzaufnahmen ist nicht optimal und möglicherweise zu verbessern. Darüber hinaus ist die offenbar empfindliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert im Detektionsbereich ein Nachteil. Hier könnte ein anderer Fluoreszenzmarker als Fluorescein eine Lösung bieten oder ein Umpuffern auf einen höheren pH-Wert, wenn dabei ein Ablösen des FIF vermieden werden könnte.

Der Austausch der Fluoreszenzmarker könnte die Färbung zusätzlich verbessern, wenn ein Marker gefunden würde, der weniger unspezifische Bindungen verursacht.

Möglicherweise könnte die Verwendung eines etwas niedrigeren pH-Wertes bei der Färbung die Spezifität erhöhen. Zwar werden dadurch auch unspezifische Bindungen gefördert, doch da im Gegensatz zur spezifischen Bindung nicht alle Formen unspezifischer Bindung zumindest so unmittelbar vom pH-Wert abhängig sind (z.B. Bindungen über den Thioharnstoffanteil des FIF oder über die Carboxylgruppe des Fluoresceinanteils), sollte mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensitätsgrenzwerte, die noch als Markierung berücksichtigt werden, eine bessere Differenzierung gelingen können. Eine Verbesserung der Methode könnte möglicherweise auch schon durch die Erhöhung der Pufferkapazität der Bindungs- und Detektionspuffer erzielt werden, da dieses die Effekte in der Mikroumgebung (siehe 4.1 und Abb. 4.3) mindern sollte. So könnte die Färbung ggf. weniger abhängig von den den pH-Wert beeinflussenden Aminosäuren sein. Da die Theorie zum Färbverhalten von FIF erst nach Fertigstellung der Arbeit aufgestellt wurde, fehlt leider eine entsprechende Untersuchung.

Diese sollte allerdings mit Peptidmembranen und nicht mit den wenigen Modellproteinen durchgeführt werden, um erkennbare und eindeutig interpretierbare Ergebnisse zu erhalten.

#### **4.3.2 Die Verwendbarkeit von FIF für die CE**

Haupt-K und seine Mitarbeiter zeigten 1996, daß die Bindung eines Cu(II)-IDA-Chelates an Proteine in der CE, also unter elektrophoretischen Bedingungen, möglich ist. Dieses Ergebnis kann für Fe(III)-IDA durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Prinzipiell kann FIF also mit CE-Methoden eingesetzt werden. Bei der Wahl der Bedingungen zur Detektion von mit FIF markiertem Ovalbumin in der CE sind die Möglichkeiten allerdings beschränkt.

Zusätzlich zu den generellen Einschränkungen durch Substanzen, die die Bindungsreaktion oder Detektion stören (siehe dazu auch 4.2.2) sowie den pH-Wert, darf die Leitfähigkeit des Laufpuffers auch nicht zu hoch sein, da es sich um eine Elektrophorese handelt. So mußte darin auf den Zusatz von Salz verzichtet werden.

Eine mögliche Anwendung von FIF in der CE wäre die Auswertung von Kinase- oder Phosphataseassays. Für die Detektion eines Kinaseassays ist dabei zu berücksichtigen, daß Kinasepuffer neben ATP und ADP Mg(II) und / oder Mn(II) enthalten muß, alles Komponenten, die mit den Bindungskomponenten wechselwirken und deshalb eine Bindung des Fe(III)-Chelates an ein nachzuweisendes Kinasesubstrat stören. Bei Phosphataseassays sind ähnliche Probleme zu erwarten. So könnten sowohl EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure) oder EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) als auch einfach ein anderer pH-Wert oder eine andere Puffersubstanz die Anwendbarkeit verhindern. Denkbar wäre zwar, solche Proben umzupuffern, doch würde dann der Aufwand erheblich. Ein einfaches Verdünnen der Probe im Laufpuffer wäre ebenfalls denkbar, doch die erzielten Ergebnisse, mit Proteinkonzentrationen von 5mg/ml, dürften sich mit FIF und dem verwendeten Puffersystem nicht genügend empfindlich machen lassen, um Realproben messen zu können. Für eine ausreichende Empfindlichkeit müßte vermutlich der Fluoreszenzmarker ausgetauscht werden, um bei pH 6 eine höhere Fluoreszenzintensität zu erhalten. Im Endeffekt wäre es dann denkbar, für eine Routineanalyse auf bestimmte Phosphatasen oder Kinasen eine Anwendung zu erarbeiten.

Da die Proteine oder Peptide bei der CE in löslicher Form vorliegen, lassen sie sich nicht mit EDC/Ethylendiamin (siehe 2.1.2.2, 2.2.5 und 4.3) behandeln. Somit fehlt eine wichtige Voraussetzung für eine Verbesserung der Spezifität der FIF-Markierung. Hier würde im Einzelfall untersucht werden

---

müssen, welche Proteine oder Peptide sich im phosphorylierten Zustand vom nicht phosphorylierten durch die Markierung mit FIF unterscheiden lassen. Daher wären einfachere Ansätze sinnvoller, wie die Verwendung von mit Fluoreszenz markierten Substraten, die ihr Wanderungsverhalten in der CE nach Phosphorylierung ausreichend verändern dürften, so daß ein Assay möglich wäre.

## 5. Zusammenfassung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit stand der Farbstoff Eisen(III)-Iminodiessigsäure-Fluorescein (FIF) zur Detektion von Phosphopeptiden bzw. -proteinen im Mittelpunkt.

Mittels per Hand auf verschiedene Blotmembranmaterialien aufgespotteter Proteine wurden zunächst die Bedingungen für eine Färbemethode ermittelt. Es erwies sich als günstig, Nitrocellulose als Matrix zu verwenden, da die markierten Proteine gut vor dem Hintergrund zu sehen waren. Die Verwendung von 50mM MES-Puffer pH 6,0 mit 1M NaCl erwies sich für die Detektion mit als bedingt geeignet. Eine schnelle Färbung mit einer Färbezeit von 30-60 Minuten war durch eine erhöhte Färbetemperatur von 60-80 °C zu erreichen.

Nach der Untersuchung der generellen Färbebedingungen wurde die Methode auf Proben angewandt, die unter realen Bedingungen hergestellt worden waren. Blots aus einem SDS-Gel mit den Modellproteinen und schließlich Blots aus 2D-Gelen mit dem Gesamtlisat von EL-4-Zellen konnten gefärbt werden.

Es wurden in der Folge an Cellulosemembranen synthetisierte Peptide gefärbt. Dadurch konnte gezeigt werden, daß auch Cellulose eine geeignete Matrix für die Färbung ist und daß auch daran immobilisierte Peptide färbbar sind. Außerdem wurde damit die Spezifität der Markierung mit FIF untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Phosphotyrosin die bevorzugt gebundene Aminosäure ist. Der Grund hierfür könnte die beste Zugänglichkeit des Phosphatrestes aufgrund der Größe von Tyrosin sein. Des weiteren sind neben Aminosäuren, die vermutlich durch unspezifische Wechselwirkung mit FIF zu dessen verstärkter Bindung beitragen, kleine, ungeladene Aminosäuren in der Umgebung der Phosphoaminosäure günstig für die Färbung. Dies spricht ebenfalls dafür, daß die Zugänglichkeit der Phosphatreste eine entscheidende Rolle bei der Färbbarkeit spielt. Schließlich wurde anhand der Peptidmembranen noch die Einsetzbarkeit von FIF zum Nachweis von Kinase- oder Phosphatasereaktionen an Substratpeptiden auf Cellulosemembranen gezeigt. Für diesen Zweck wurde außerdem nachgewiesen, daß an Sepharosebeads über Immunkomplexe gebundene Kinasen in der Lage sind, Peptide und Proteine auf Membranen zu phosphorylieren.

Zuvor wurde die Anwesenheit von Kinasen in einem solchen Immunopräzipitat des Interleukin-1-Rezeptors Typ I durch eine Regenerierung von Kinaseaktivität im SDS-Gel belegt.

Die für die Arbeiten benötigten EL-4-Zellen und ein E.coli-Vektor für Interleukin-1 wurden in selbst durchgeführten Kultivierungen erhalten.

Neben der Verwendung für Membranfärbemethoden konnte auch gezeigt werden, daß FIF

prinzipiell in der Kapillarelektrophorese einsetzbar ist.

Zuletzt wurde eine Theorie zum Färbeverhalten von FIF aufgestellt, die die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und aus der Literatur erklärt.

## 6. Anhang

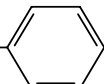
### 6.1 Struktur der verwendeten Aminosäuren

A Alanin  $R-CH_3$

C Cystein  $R-CH_2-SH$

D Asparaginsäure  $R-CH_2-COO^-$

E Glutaminsäure  $R-CH_2-CH_2-COO^-$

F Phenylalanin  $R-CH_2-$  

G Glycin  $R-H$

H Histidin  $R-CH_2-C(=NH)-NH^+-CH_2$

I Isoleucin  $R-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

K Lysin  $R-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+$

L Leucin  $R-CH_2-CH(CH_3)_2$

M Methionin  $R-CH_2-CH_2-S-CH_3$

N Asparagin  $R-CH_2-C(=O)-NH_2$

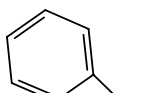
P Prolin  $OOC-CH(NH_2^+)-CH_2-CH_2$

Q Glutamin  $R-CH_2-CH_2-C(=O)-NH_2$

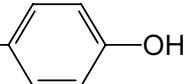
R Arginin  $R-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NH_2^+)-NH_2$

S Serin  $R-CH_2-OH$

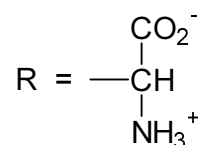
T Threonin  $R-CH(OH)-CH_3$

V Valin  $R-CH(CH_3)_2$  

W Tryptophan  $R-CH_2-C(=CH)-NH$

Y Tyrosin  $R-CH_2-$  

Die Buchstaben stehen nach dem international üblichen Code für die genannten Aminosäuren.



## 6.2 Liste der verwendeten Peptidsequenzen

*Membran 1: nicht  
phosphorylierte  
Peptide*

1	AAAAAEY	57	RERSERE	113	LELTELE
2	AAAAAET	58	AAAAAHY	114	LELSELE
3	AAAAAES	59	AAAAAHT	115	KKKYQQQ
4	AAAEEDY	60	AAAAAHS	116	KKKTQQQ
5	AAAEEDT	61	HHHYHHH	117	KKKSQQQ
6	AAAEEDS	62	HHHTHHH	118	KQKYQKQ
7	EEYEEDD	63	HHHSHHH	119	KQKTQKQ
8	EEETEED	64	AHAYAHA	120	KQKSQKQ
9	EEESEED	65	AHATAHA	121	AAAAAFY
10	AEAYAEA	66	AHASAHA	122	AAAAAFT
11	AEATAEA	67	HHHYEEE	123	AAAAAFS
12	AEASAEA	68	HHHTEEE	124	FFFYFFF
13	AEAYEAE	69	HHHEEEE	125	FFFTFFF
14	AEATEAE	70	HEHYEHE	126	FFFSFFF
15	AEASEAE	71	HEHTEHE	127	AFAYAFA
16	AAAAAQY	72	HEHSEHE	128	AFATAFA
17	AAAAAQT	73	KREYERK	129	AFASAFA
18	AAAAAQS	74	KRETERK	130	AAAAAAY
19	QQQYQQQ	75	KRESERK	131	AAAAAYT
20	QQQTQQQ	76	KERYREK	132	AAAAAYS
21	QQQSQQQ	77	KERTREK	133	YYYYYYY
22	AQAYAQA	78	KERSREK	134	YYTYYYY
23	AQATAQA	79	REKYKER	135	YYYSYYY
24	AQASQAQ	80	REKTKER	136	AYAYAYA
25	AAAAAKY	81	REKSKER	137	AYATAYA
26	AAAAAKT	82	RKEYEKR	138	AYASAYA
27	AAAAAKS	83	RKETEKR	139	AAAAASY
28	KKKYKKK	84	RKESEKR	140	AAAAAST
29	KKKTKKK	85	EKRYRKE	141	AAAAASS
30	KKKSKKK	86	EKRTRKE	142	SSSYSSS
31	AKAYAKA	87	EKRSRKE	143	SSSTSSS
32	AKATAKA	88	ERKYKRE	144	SSSSSSS
33	AKASAKA	89	ERKTKRE	145	ASAYASA
34	KAKYAKA	90	ERKSKRE	146	ASATASA
35	KAKTAKA	91	KREYKRE	147	ASASASA
36	KAksAKA	92	KRETKRE	148	AAAAFEY
37	KKKYEEE	93	KRESKRE	149	AAAAFET
38	KKKTEEE	94	KERYKER	150	AAAAFES
39	KKKSEEE	95	KERTKER	151	AAAAEFY
40	KEKYEKE	96	KERSKER	152	AAAAEFT
41	KEKTEKE	97	RKEYRKE	153	AAAAEFS
42	KEKSEKE	98	RKETRKE	154	AEFYFEA
43	AAAAARY	99	RKESRKE	155	AEFTFEA
44	AAAAART	100	AAAAALY	156	AEFSFEA
45	AAAAARS	101	AAAAALT	157	AFEYEFA
46	RRRYRRR	102	AAAAALS	158	AFETEFA
47	RRRTRRR	103	LLLYLLL	159	AFESEFA
48	RRRSRRR	104	LLLTLLL	160	EFEYEFE
49	ARAYARA	105	LLLSLLL	161	EFETEFE
50	ARATARA	106	ALAYALA	162	EFESEFE
51	ARASARA	107	ALATALA	163	FEFYFEF
52	RRRYEEE	108	ALASALA	164	FEFTFEF
53	RRRTEEE	109	LLLYEEE	165	FEFSFEF
54	RRRSEEE	110	LLLTEEE	166	AAAAFKY
55	RERYERE	111	LLLSEEE	167	AAAAFKT
56	RERTERE	112	LELYELE	168	AAAAFKS



169	AAAAKFY	233	AAAAKYT	297	FLFSFLF
170	AAAAKFT	234	AAAAKYS	298	AQYYYQA
171	AAAAKFS	235	AKYYYKA	299	AQYTYQA
172	AKFYFKA	236	AKYTYKA	300	AQYSYQA
173	AKFTFKA	237	AKYSYKA	301	AYQYQYA
174	AKFSFKA	238	AYKYKYA	302	AYQTQYA
175	AFKYKFA	239	AYKTKYA	303	AYQSQYA
176	AFKTKFA	240	AYKSKYA	304	QYQYQYQ
177	AFKSKFA	241	KYKYKYK	305	QYQTQYQ
178	KFKYKFK	242	KYKTKYK	306	QYQSQYQ
179	KFKTKFK	243	KYKSKYK	307	YQYYYQY
180	KFKSKFK	244	YKYYYKY	308	YQYTYQY
181	FKFYFKF	245	YKYTYKY	309	YQYSYQY
182	FKFTFKF	246	YKYSYKY	310	AAAAYLY
183	FKFSFKF	247	YEKYKEY	311	AAAAYLT
184	FEKYKEF	248	YEKTKEY	312	AAAAYLS
185	FEKTEKF	249	YEKSEY	313	AAAALYY
186	FEKSKEF	250	KYEYKEY	314	AAAALYT
187	KFEYEFK	251	KYETEEK	315	AAAALYS
188	KFETEFK	252	KYESEYK	316	ALYYyla
189	KFESEFK	253	EKYYYKE	317	ALYTYLA
190	EKFYFKE	254	EKYTYKE	318	ALYSYLA
191	EKFTFKE	255	EKYSYKE	319	AYLYLYA
192	EKFSFKE	256	EYKYKYE	320	AYLTLYA
193	EFKYKFE	257	EYKTKYE	321	AYLSLYA
194	EFKTKFE	258	EYKSKYE	322	LYLYLYL
195	EFKSKFE	259	YKEYEKY	323	LYLTLYL
196	FKEYEKF	260	YKETEKY	324	LYLSLYL
197	FKETEFK	261	YKESEKY	325	YLYYYLY
198	FKESEKF	262	KEYYYEK	326	YLYTYLY
199	KEFYFEK	263	KEYTYEK	327	YLYSYLY
200	KEFTFEK	264	KEYSYEK	328	YQLYLQY
201	KEFSFEK	265	KEYYKEY	329	YQLTLQY
202	KEFYKEF	266	KEYTKEY	330	YQLSLQY
203	KEFTKEF	267	KEYSKEY	331	YLQYQLY
204	KEFSKEF	268	EKYEEKY	332	YLQTQLY
205	EKFYEKF	269	EKYTEKY	333	YLQSQLY
206	EKFTEKF	270	EKYSEKY	334	QLYYYLQ
207	EKFSEKF	271	EYKYEYK	335	QLYTYLQ
208	EFKYEFK	272	EYKTEYK	336	QLYSYLQ
209	EFKTEFK	273	EYKSEYK	337	QYLYLYQ
210	EFKSEFK	274	AQFYFQA	338	QYLTLYQ
211	AAAAYEY	275	AQFTFQA	339	QYLSLYQ
212	AAAAYET	276	AQFSFQA	340	LYQYQYL
213	AAAAYES	277	AFQYQFA	341	LYQTQYL
214	AAAAYEY	278	AFQTQFA	342	LYQSQYL
215	AAAAYET	279	AFQSQFA	343	LQYYYQL
216	AAAAYEY	280	QFQYQFQ	344	LQYTYQL
217	AEYYYEA	281	QFQTQFQ	345	LQYSYQL
218	AEYTYEA	282	QFQSQFQ	346	YQLYYQL
219	AEFSYEA	283	FQFYFQF	347	YQLTYQL
220	AYEYEA	284	FQFTFQF	348	YQLSYQL
221	AYETEA	285	FQFSFQF	349	YLQYYLQ
222	AYESEYA	286	ALFYFLA	350	YLQTYLQ
223	EYEEYE	287	ALFTFLA	351	YLQSYLQ
224	EYETEYE	288	ALFSFLA	352	LYQYLYQ
225	EYEEYE	289	AFLYLFA	353	LYQTLYQ
226	YEYYYEY	290	AFLTFLA	354	LYQSLYQ
227	YEYTYEY	291	AFLSLFA	355	SASYSAS
228	YEYSYEY	292	LFLYLFL	356	SASTSAS
229	AAAAYKY	293	LFLTFL	357	SASSSAS
230	AAAAYKT	294	LFLSLFL	358	SASYASA
231	AAAAYKS	295	FLFYFLF	359	SASTASA
232	AAAAKYY	296	FLFTFLF	360	SASSASA

361	AAAAATY	425	KREFERK	55	RERyERE
362	AAAAATT			56	RERtERE
363	AAAAATS			57	RERsERE
364	TTYTTT			58	AAAAAHy
365	TTTTTT			59	AAAAAHt
366	TTTSTTT			60	AAAAAHs
367	ATAYATA		<b>Membran 2:</b>	61	HHHyHHH
368	ATATATA		<b>phosphorylierte</b>	62	HHHtHHH
369	ATASATA		<b>Peptide</b>	63	HHHsHHH
370	YAYYYAY			64	AHAyAHA
371	YAYTYAY	1	AAAAAEy	65	AHAAtAHA
372	YAYSAY	2	AAAAAEt	66	AHAsAHA
373	YAYYAYA	3	AAAAAEs	67	HHHyEEE
374	YAYTAYA	4	AAAAEEy	68	HHHtEEE
375	YAYSAYA	5	AAAAEEt	69	HHHsEEE
376	AAAYAAA	6	AAAAEEs	70	HEHyEHE
377	AAATAAA	7	EEEyEEE	71	HEHtEHE
378	AAASAAA	8	EEEtEEE	72	HEHsEHE
379	AAAAAVY	9	EEEsEEE	73	KREyERK
380	AAAAAVT	10	AEAyAEA	74	KREtERK
381	AAAAAVS	11	AEAtAEA	75	KREsERK
382	VVVYVVV	12	AEAsAEA	76	KERyREK
383	VVVTVVV	13	AEAyEAE	77	KERtREK
384	VVVSVVV	14	AEAtEAE	78	KERsREK
385	AVAYAVA	15	AEAsEAE	79	REKyKER
386	AVATAVA	16	AAAAAQy	80	REKtKER
387	AVASAVA	17	AAAAAQs	81	REKsKER
388	FAFYFAF	18	AAAAAQs	82	RKEyEKR
389	FAFTFAF	19	QQQyQQQ	83	RKEtEKR
390	FAFSFAF	20	QQQtQQQ	84	RKEsEKR
391	FAFYAFA	21	QQQsQQQ	85	EKRyRKE
392	FAFTAFA	22	AQAYAQA	86	EKRtRKE
393	FAFSAFA	23	AQAtAQA	87	EKRsRKE
394	GGGYAAA	24	AQAsAQA	88	ERKyKRE
395	GGGTAAA	25	AAAAAKy	89	ERKtKRE
396	GGGSAAA	26	AAAAAKt	90	ERKsKRE
397	VVVEYLLL	27	AAAAAKs	91	KREyKRE
398	VVVSLLL	28	KKKyKKK	92	KREtKRE
399	IIYPPP	29	KKKtKKK	93	KREsKRE
400	IIITPPP	30	KKKsKKK	94	KERyKER
401	IIISPPP	31	AKAyAKA	95	KERtKER
402	WWWYCCC	32	AKAtAKA	96	KERsKER
403	WWWTCCC	33	AKAsAKA	97	RKEyRKE
404	WWWSCCC	34	KAKyAKA	98	RKEtRKE
405	EEEEEEE	35	KAKtAKA	99	RKEsRKE
406	FFFFFFF	36	KAKsAKA	100	AAAAALy
407	EEFFFFE	37	KKKyEEE	101	AAAAALt
408	EFEFEFE	38	KKKtEEE	102	AAAAALs
409	EEFEFEFE	39	KKKsEEE	103	LLLyLLL
410	FFFEFFF	40	KEKyEKE	104	LLLtLLL
411	KKKKKKK	41	KEKtEKE	105	LLLsLLL
412	KKKKEEE	42	KEKsEKE	106	ALAyALA
413	KKKKFFK	43	AAAAARy	107	ALAtALA
414	KFKFKFK	44	AAAAARt	108	ALAsALA
415	KEFEKEK	45	AAAAARs	109	LLLyEEE
416	EKKFKEK	46	RRRyRRR	110	LLLtEEE
417	RRRRRRR	47	RRRtRRR	111	LLLsEEE
418	RRRREEE	48	RRRsRRR	112	LELyELE
419	RRRRFFR	49	ARAYARA	113	LELtELE
420	RFRFRFR	50	ARAtARA	114	LELsELE
421	REFERER	51	ARAsARA	115	KKKyQQQ
422	ERRFRER	52	RRRyEEE	116	KKKtQQQ
423	KERFKER	53	RRRtEEE	117	KKKsQQQ
424	KRKFRKR	54	RRRsEEE	118	KQKyQKQ

119	KQKtQKQ	183	FKFsFKF	247	YEKyKEY
120	KQKsQKQ	184	FEKyKEF	248	YEKtKEY
121	AAAAAFy	185	FEKtKEF	249	YEKsKEY
122	AAAAAFt	186	FEKsKEF	250	KYEyEYK
123	AAAAAFs	187	KFEyEFK	251	KYEtEYK
124	FFFyFFF	188	KFEtEFK	252	KYEsEYK
125	FFFtFFF	189	KFEsEFK	253	EKYyYKE
126	FFFsFFF	190	EKFyFKE	254	EKYtYKE
127	AFAyAFA	191	EKFtFKE	255	EKYsYKE
128	AFAtAFA	192	EKFfFKE	256	EYKyKYE
129	AFAsAFA	193	EFKyKFE	257	EYKtKYE
130	AAAAAYy	194	EFKtKFE	258	EYKsKYE
131	AAAAAYt	195	EFKsKFE	259	YKEyEKY
132	AAAAAYs	196	FKEyEKF	260	YKEtEKY
133	YYYyYYY	197	FKEtEKF	261	YKEsEKY
134	YYYtYYY	198	FKEsEKF	262	KEYyYEK
135	YYYsYYY	199	KEFyFEK	263	KEYtYEK
136	AYAyAYA	200	KEFtFEK	264	KEYsYEK
137	AYAtAYA	201	KEFsFEK	265	KEYyKEY
138	AYAsAYA	202	KEFyKEF	266	KEYtKEY
139	AAAAASy	203	KEFtKEF	267	KEYsKEY
140	AAAAASt	204	KEFsKEF	268	EKYyEKY
141	AAAAASs	205	EKFyEKF	269	EKYtEKY
142	SSSySSS	206	EKFtEKF	270	EKYsEKY
143	SSStSSS	207	EKFfEKF	271	EYKyEYK
144	SSSSSSS	208	EFKyEFK	272	EYKtEYK
145	ASAyASA	209	EFKtEFK	273	EYKsEYK
146	ASAtASA	210	EFKsEFK	274	AQFyFQA
147	ASAsASA	211	AAAAYEy	275	AQFtFQA
148	AAAAFEy	212	AAAAYEt	276	AQFsFQA
149	AAAAFEt	213	AAAAYEs	277	AFQyQFA
150	AAAAFEs	214	AAAAEYy	278	AFQtQFA
151	AAAAEFy	215	AAAAEYt	279	AFQsQFA
152	AAAAEFt	216	AAAAEYs	280	QFQyQFQ
153	AAAAEFs	217	AEYyYEA	281	QFQtQFQ
154	AEFyFEA	218	AEYtYEA	282	QFQsQFQ
155	AEFtFEA	219	AEFsYEA	283	FQFyFQF
156	AEFsFEA	220	AYEyEYA	284	FQFtFQF
157	AFEyEFA	221	AYEtEYA	285	FQFsFQF
158	AFEtEFA	222	AYEsEYA	286	ALFyFLA
159	AFEsEFA	223	EYEyEYE	287	ALFtFLA
160	EFEyEFE	224	EYEtEYE	288	ALFsFLA
161	EFEtEFE	225	EYEsEYE	289	AFLyLFA
162	EFEsEFE	226	YEYyYey	290	AFLtLFA
163	FEFyFEF	227	YEYtYey	291	AFLsLFA
164	FEFtFEF	228	YEsYey	292	LFLyLFL
165	FEFsFEF	229	AAAAYKy	293	LFLtLFL
166	AAAAAFKy	230	AAAAYKt	294	LFLsLFL
167	AAAAAFKt	231	AAAAYKs	295	FLFyFLF
168	AAAAAFKs	232	AAAAYKy	296	FLFtFLF
169	AAAAAFy	233	AAAAYKt	297	FLFsFLF
170	AAAAAFt	234	AAAAYKs	298	AQYyYQA
171	AAAAAFs	235	AKYyYKA	299	AQYtYQA
172	AKFyFKA	236	AKYtYKA	300	AQYsYQA
173	AKFtFKA	237	AKYsYKA	301	AYQyQYA
174	AKFsFKA	238	AYKyKYA	302	AYQtQYA
175	AFKyKFA	239	AYKtKYA	303	AYQsQYA
176	AFKtKFA	240	AYKsKYA	304	QYQyQYQ
177	AFKsKFA	241	KYKyKYK	305	QYQtQYQ
178	KFKyKFK	242	KYKtKYK	306	QYQsQYQ
179	KFKtKFK	243	KYKsKYK	307	YQYyYQY
180	KFKsKFK	244	YKYyYKY	308	YQYtYQY
181	FKFyFKF	245	YKYtYKY	309	YQYsYQY
182	FKFtFKF	246	YKYsYKY	310	AAAAYLy

311	AAAAYLt	375	YAYsAYA
312	AAAAYLs	376	AAAYAAA
313	AAAALYy	377	AAAtAAA
314	AAAALYt	378	AAAsAAA
315	AAAALYs	379	AAAAAVy
316	ALYyYLA	380	AAAAAVt
317	ALYtYLA	381	AAAAAVs
318	ALYsYLA	382	VVVyVVV
319	AYLyLYA	383	VVVtVVV
320	AYLtLYA	384	VVVsVVV
321	AYLsLYA	385	AVAyAVA
322	LYLyLYL	386	AVAtAVA
323	LYLtLYL	387	AVAsAVA
324	LYLsLYL	388	FAFyFAF
325	YLYyYLY	389	FAFtFAF
326	YLYtYLY	390	FAFsFAF
327	YLYsYLY	391	FAFyAFA
328	YQLyLQY	392	FAFtAFA
329	YQLtLQY	393	FAFsAFA
330	YQLsLQY	394	GGGyAAA
331	YLQyQLY	395	GGGtAAA
332	YLQtQLY	396	GGGsAAA
333	YLQsQLY	397	VVVyLLL
334	QLYyYLQ	398	VVVtLLL
335	QLYtYLQ	399	IIIyPPP
336	QLYsYLQ	400	IIItPPP
337	QYLyLYQ	401	IIIIsPPP
338	QYLtLYQ	402	WWWyCCC
339	QYLsLYQ	403	WWWtCCC
340	LYQyQYL	404	WWWsCCC
341	LYQtQYL		
342	LYQsQYL		
343	LQYyYQL		
344	LQYtYQL		
345	LQYsYQL		
346	YQLyYQL		
347	YQLtYQL		
348	YQLsYQL		
349	YLQyYLQ		
350	YLQtYLQ		
351	YLQsYLQ		
352	LYQyLYQ		
353	LYQtLYQ		
354	LYQsLYQ		
355	SASySAS		
356	SASsSAS		
357	SASsSAS		
358	SASyASA		
359	SASsASA		
360	SASsASA		
361	AAAAATy		
362	AAAAATt		
363	AAAAATs		
364	TTTyTTT		
365	TTTtTTT		
366	TTTsTTT		
367	ATAyATA		
368	ATAtATA		
369	ATAsATA		
370	YAYyYAY		
371	YAYtYAY		
372	YAYsYAY		
373	YAYyAYA		
374	YAYtAYA		

\*Kleinbuchstaben  
stehen für die  
phosphorylierte Form  
der jeweiligen  
Aminosäure

Abb. 6.1:  
Liste der Peptide auf den  
Peptidmembranen zur  
Untersuchung des  
Färbeverhaltens von FIF

### 6.3 Ergänzende Abbildungen

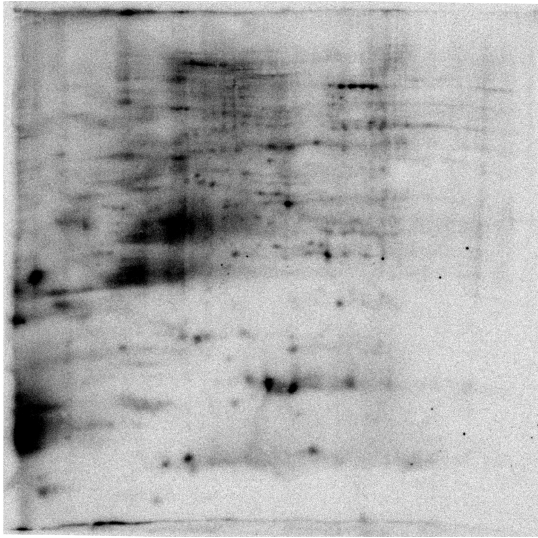


Abb. 6.2 A: Radioaktivmuster von EL-4-2D-Blot

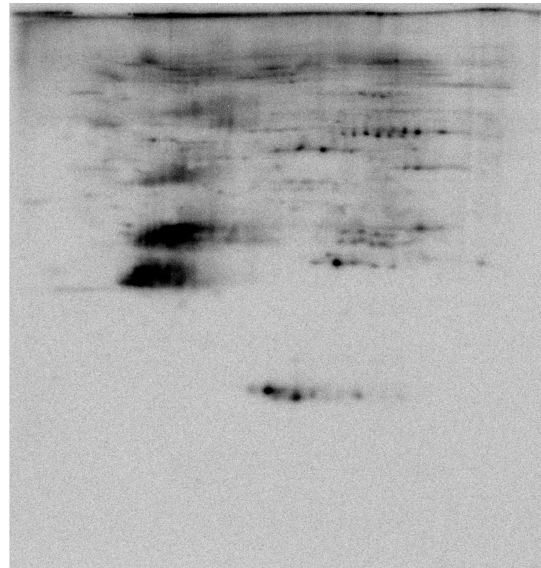


Abb. 6.2 B: Radioaktivmuster von EL-4-2D-Gel nach Blot

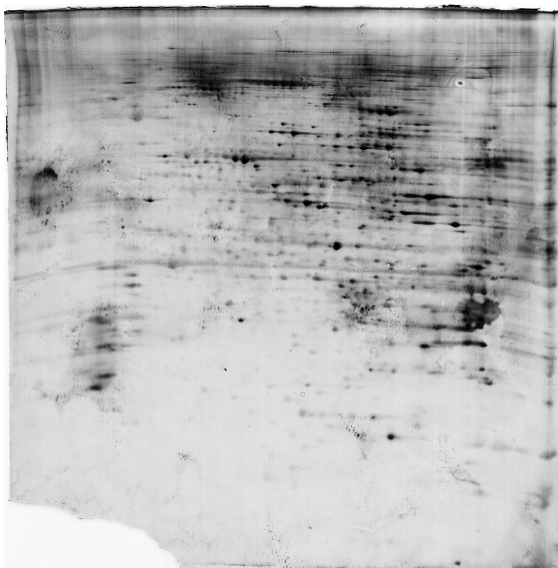


Abb. 6.2 D: Gesamtprotein von EL-4-2D-Gel nach Blot



Abb. 6.2 C: FIF-markierte Proteine auf EL-4-2D-Blot

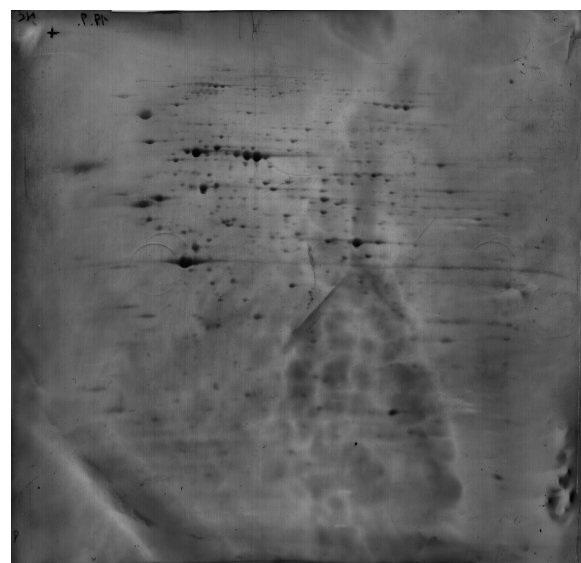


Abb. 6.2 E: Gesamtproteinmuster von EL-4-2D-Blot

Die Abbildungen 6.2 A bis E sind aus EL-4-Zellen, die mit Interleukin-1 stimuliert worden waren, erstellt worden. Die Molekulargewichte nehmen jeweils von oben nach unten ab, der pH-Wert jeweils von links nach rechts zu.

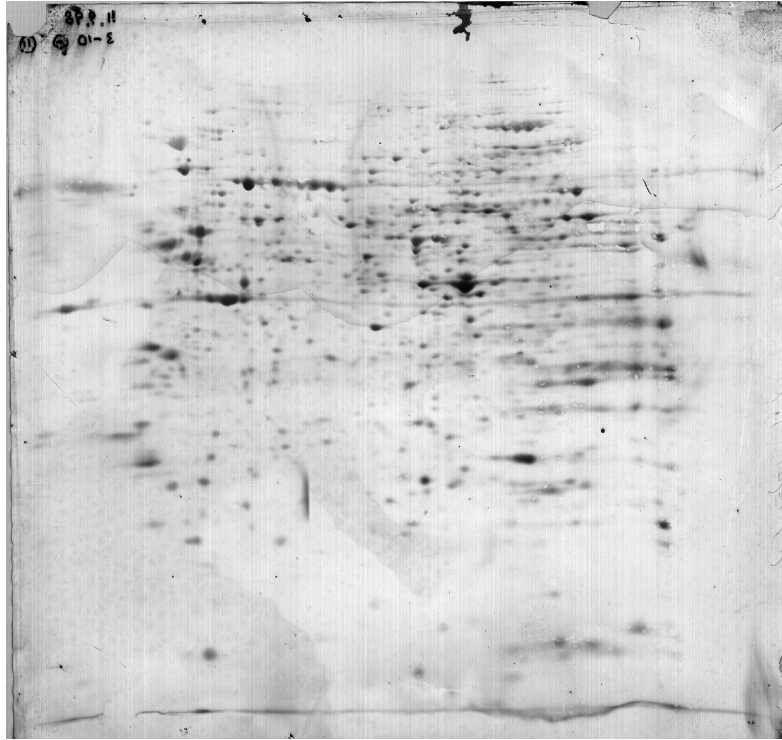


Abb. 6.3 A: Gesamtproteinmuster von EL-4-2D-Blot

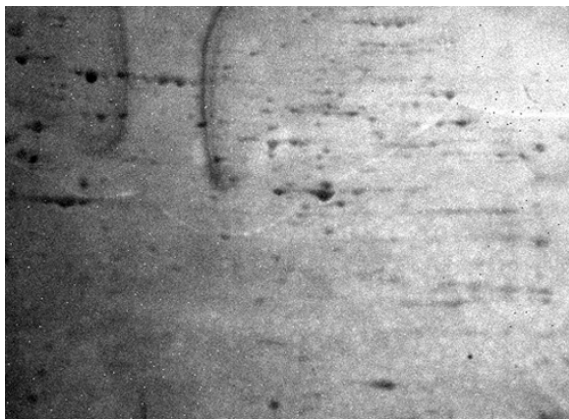


Abb. 6.3 B: Gesamtproteinmuster von EL-4-2D-Blot aufgenommen mit der CCD-Kamera für die Fluoreszenzdetektion

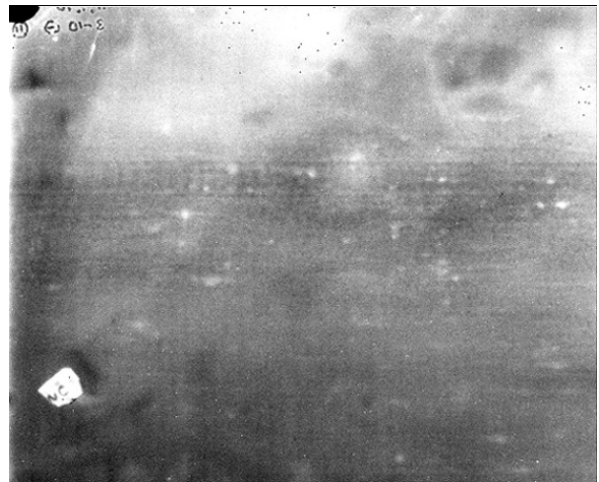


Abb. 6.3 C: FIF-markierte Proteine auf EL-4-2D-Blot

Die Abbildungen 6.3 A bis C sind aus EL-4-Zellen, die nicht stimuliert worden waren, erstellt worden. Die Molekulargewichte nehmen jeweils von oben nach unten ab, der pH-Wert jeweils von links nach rechts zu.

Spot-Nr.: 1 - 25  
 26 - 50  
 51 - 75  
 76 - 100  
 101 - 125  
 126 - 150  
 151 - 175  
 176 - 200  
 201 - 225  
 226 - 250  
 251 - 275  
 276 - 300  
 301 - 325  
 326 - 350  
 351 - 375  
 376 - 400  
 401 - 425

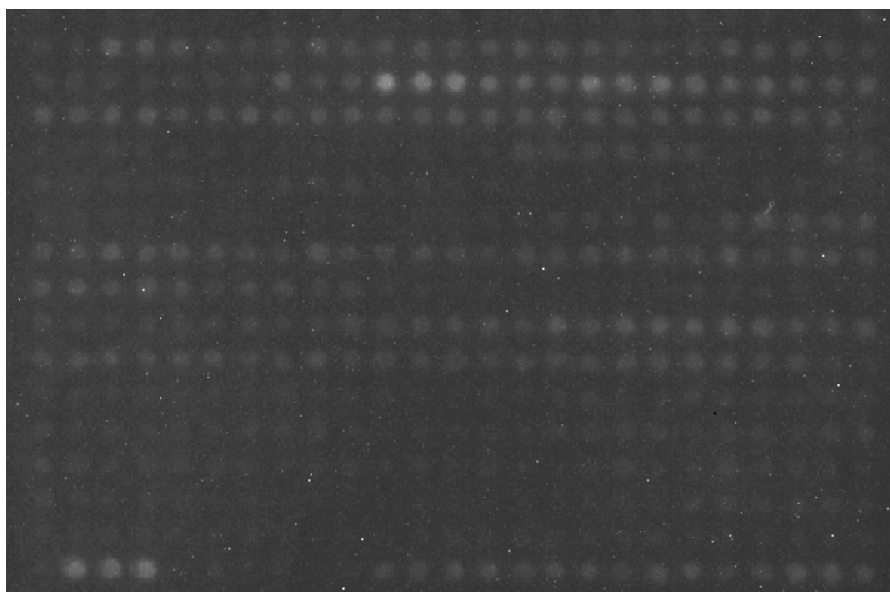


Abb. 6.4 A: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden vor der Färbung mit FIF

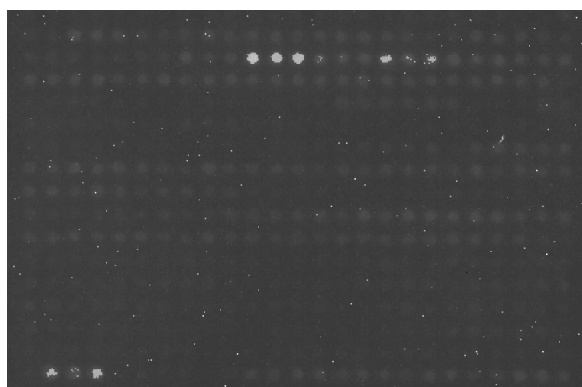


Abb. 6.4 B: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden vor der Färbung mit FIF

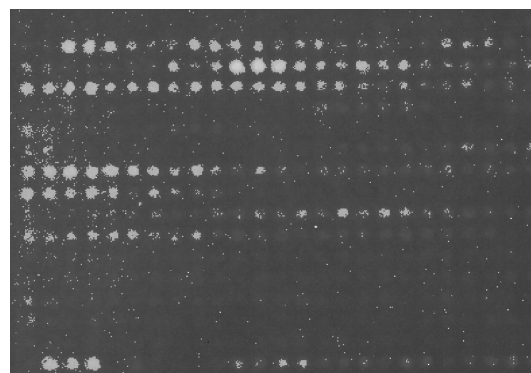


Abb. 6.5 B: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden nach der Färbung mit FIF

Spot-Nr.: 1 - 25  
 26 - 50  
 51 - 75  
 76 - 100  
 101 - 125  
 126 - 150  
 151 - 175  
 176 - 200  
 201 - 225  
 226 - 250  
 251 - 275  
 276 - 300  
 301 - 325  
 326 - 350  
 351 - 375  
 376 - 400  
 401 - 425

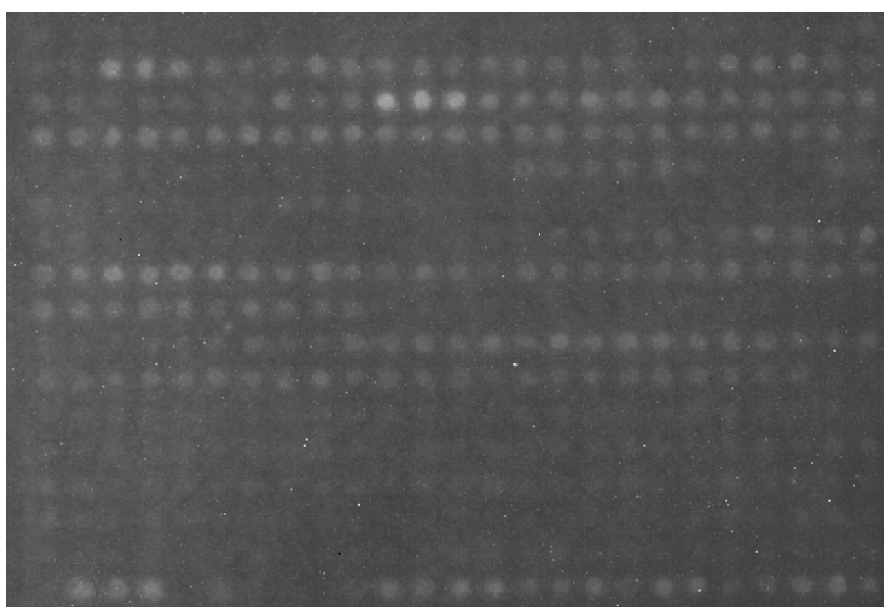


Abb. 6.5 A: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden nach der Färbung mit FIF

Spot-Nr.: 1 - 25  
 26 - 50  
 51 - 75  
 76 - 100  
 101 - 125  
 126 - 150  
 151 - 175  
 176 - 200  
 201 - 225  
 226 - 250  
 251 - 275  
 276 - 300  
 301 - 325  
 326 - 350  
 351 - 375  
 376 - 400  
 401 - 425

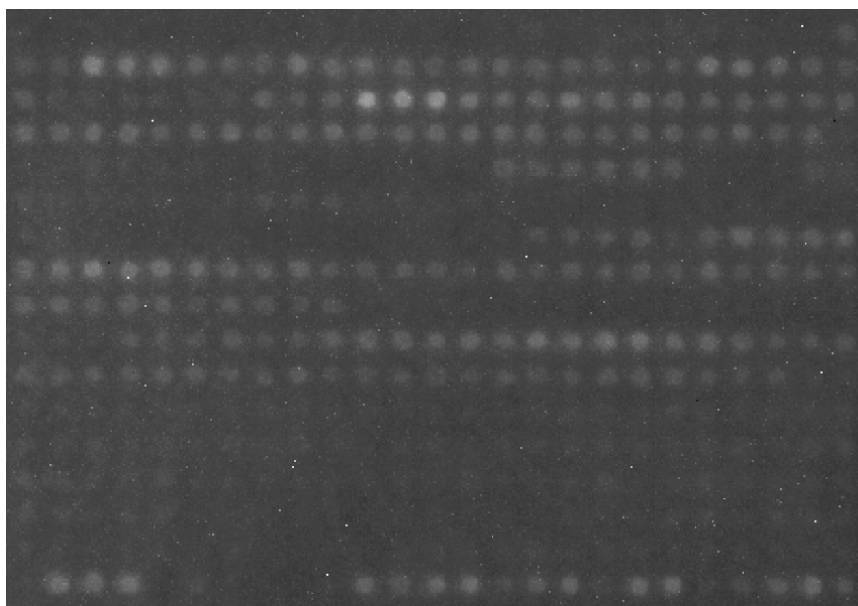


Abb. 6.6 A: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden nach der Elution von FIF

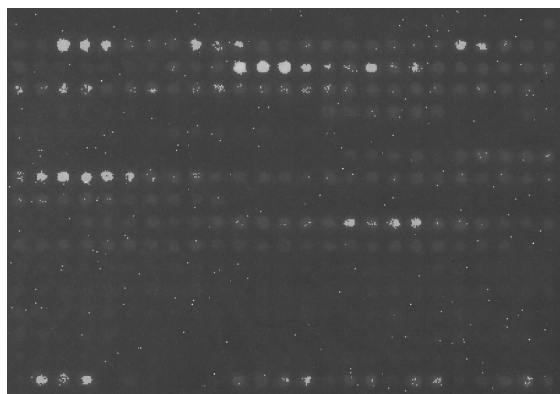


Abb. 6.6 B: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden nach der Elution von FIF

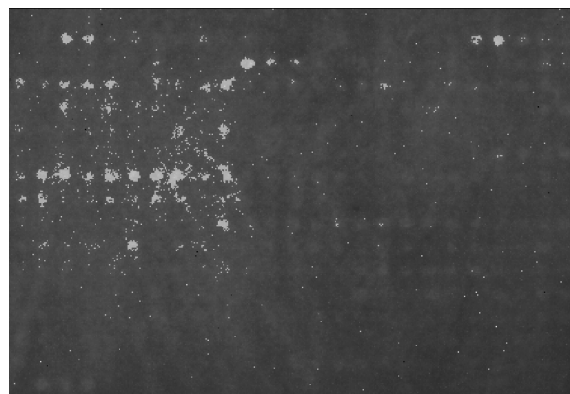


Abb. 6.7 B: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden nach der Färbung mit Fluorescein

Spot-Nr.: 1-25  
 26 - 50  
 51 - 75  
 76 - 100  
 101 - 125  
 126 - 150  
 151 - 175  
 176 - 200  
 201 - 225  
 226 - 250  
 251 - 275  
 276 - 300  
 301 - 325  
 326 - 350  
 351 - 375  
 376 - 400  
 401 - 425

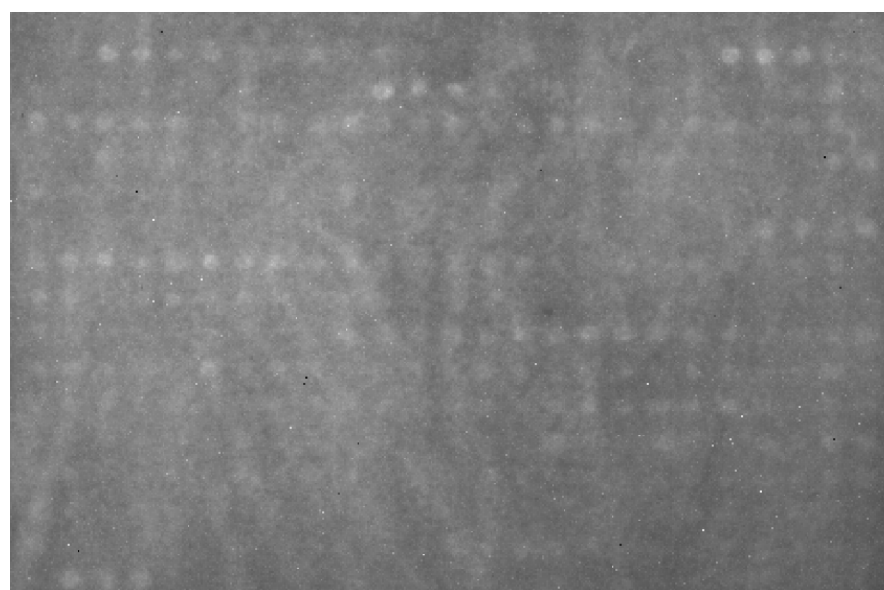


Abb. 6.7 A: Membran mit nicht phosphorylierten Peptiden nach der Färbung mit Fluorescein



Spot-Nr.: 1-25  
 26 - 50  
 51 - 75  
 76 - 100  
 101 - 125  
 126 - 150  
 151 - 175  
 176 - 200  
 201 - 225  
 226 - 250  
 251 - 275  
 276 - 300  
 301 - 325  
 326 - 350  
 351 - 375  
 376 - 400  
 401 - 425

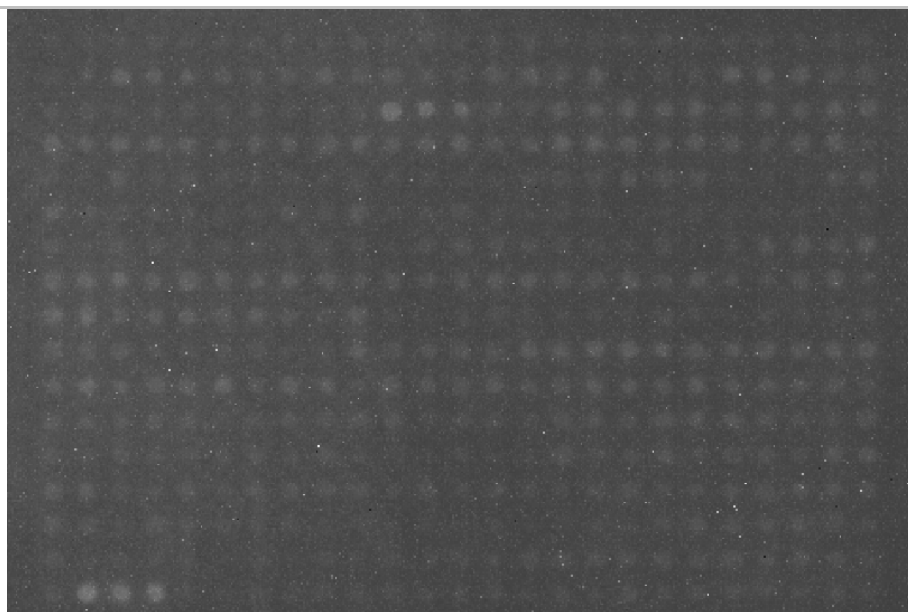


Abb. 6.8 A: Phosphopeptidmembran vor der Färbung mit FIF

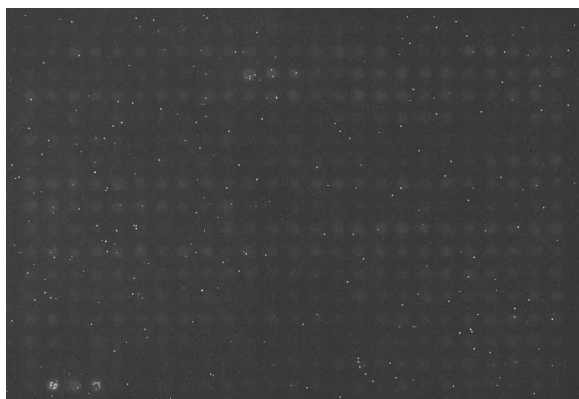


Abb. 6.8 B: Phosphopeptidmembran vor der Färbung mit FIF

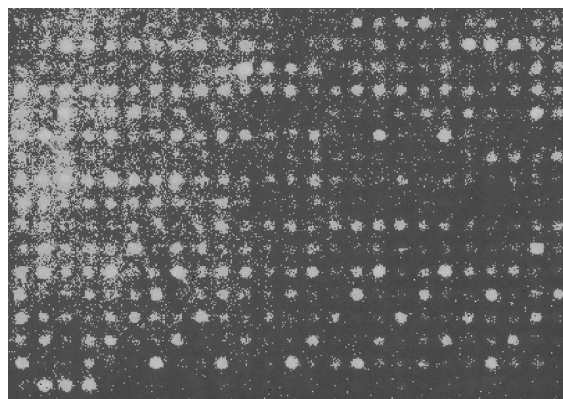


Abb. 6.9 B: Phosphopeptidmembran nach der Färbung mit FIF

Spot-Nr.: 1-25  
 26 - 50  
 51 - 75  
 76 - 100  
 101 - 125  
 126 - 150  
 151 - 175  
 176 - 200  
 201 - 225  
 226 - 250  
 251 - 275  
 276 - 300  
 301 - 325  
 326 - 350  
 351 - 375  
 376 - 400  
 401 - 425

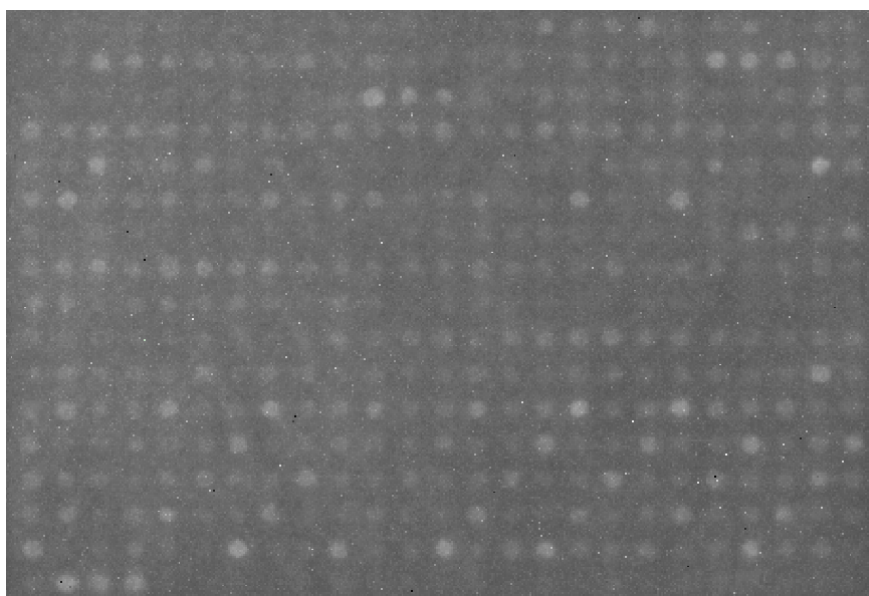


Abb. 6.9 A: Phosphopeptidmembran nach der Färbung mit FIF

Spot-Nr.: 1 - 25  
26 - 50  
51 - 75  
76 - 100  
101 - 125  
126 - 150  
151 - 175  
176 - 200  
201 - 225  
226 - 250  
251 - 275  
276 - 300  
301 - 325  
326 - 350  
351 - 375  
376 - 400  
401 - 425

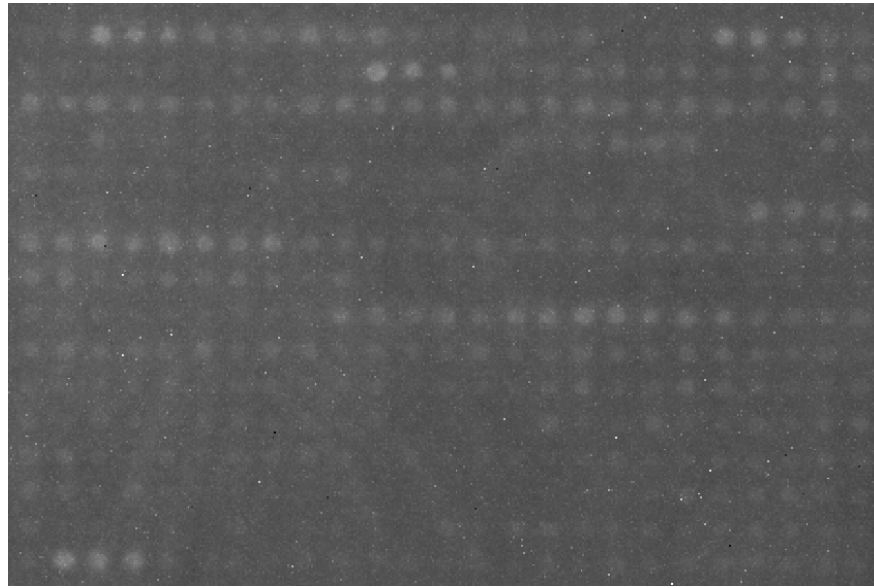


Abb. 6.10 A: Phosphopeptidmembran nach der Elution von FIF

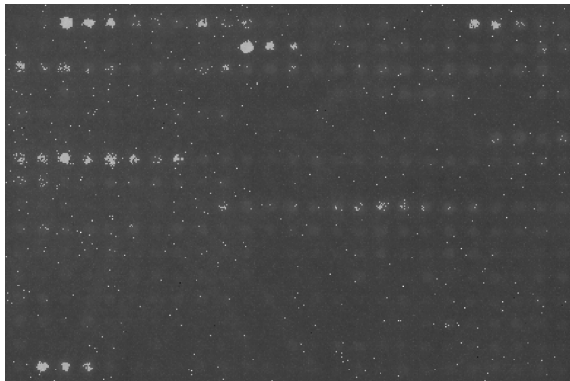


Abb. 6.10 B: Phosphopeptidmembran nach der Elution von FIF

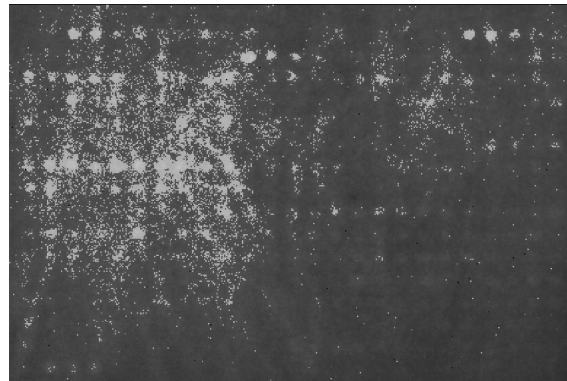


Abb. 6.11 B: Phosphopeptidmembran nach der Färbung mit Fluorescein

Spot-Nr.: 1 - 25  
26 - 50  
51 - 75  
76 - 100  
101 - 125  
126 - 150  
151 - 175  
176 - 200  
201 - 225  
226 - 250  
251 - 275  
276 - 300  
301 - 325  
326 - 350  
351 - 375  
376 - 400  
401 - 425

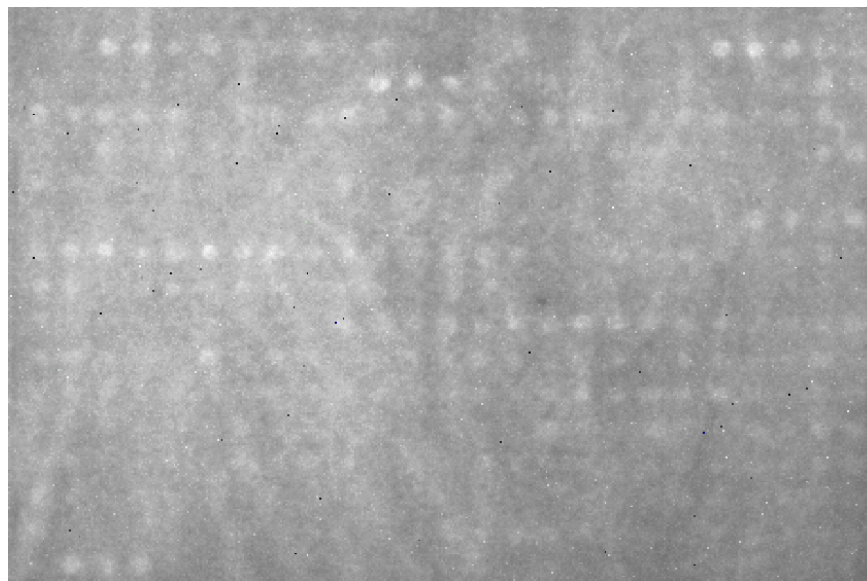


Abb. 6.11 A: Phosphopeptidmembran nach der Färbung mit Fluorescein

**Anmerkung zu den Abbildungen 6.4 A bis 6.11 B:**

Die mit der Software für die Fluoreszenzdetektion aufgenommenen Bilder wurden zunächst mit Photoshop mit Hilfe der Funktion Gradiationskurven bearbeitet. Dabei wurde von beiden Peptidmembranen getrennt jeweils die Aufnahme mit den höchsten Helligkeitswerten (dies waren die mit den Fluorescein gefärbten Membranen) verwendet und das Bild so eingestellt, daß die Aufnahme nach Augenmaß einen guten Kontrast und eine ausreichende Helligkeit zeigte. Diese Einstellungen wurden dann auch auf die anderen Aufnahmen der jeweiligen Membran angewendet. Von den so erhaltenen Abbildungen wurden Windows Metafiles (wmf-Dateien) erstellt und diese in den Text eingebunden. Die so gewonnenen Abbildungen entsprechen den Abbildungen 6.4-11 A. Die kleineren Abbildungen (6.4-11 B) wurden durch eine weitere Bearbeitung mit Word Perfect erreicht, um die Beurteilung der relativen Fluoreszenzintensitäten zu erleichtern. Hier wurde von den Bildern von jeder Membran einheitlich der Kontrast und die Helligkeit so verändert, daß eine maximale Zahl von Spots vor einem geringen Hintergrund erkennbar sind.

## Literatur (alphabetisch)

Alberts-B, Bray-D, Lewis-J, Raff-M, Roberts-K, Watson-JD; Molekularbiologie der Zelle; 1995; VCH Verlag

Anderson-NL, Anderson-NG; Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words; 1998; Electrophoresis; 19; 1853-61

Andersson-L, Porath-J; Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal ( $\text{Fe}^{3+}$ ) Affinity Chromatography; 1986; Anal. Biochem.; 154; 250-54

Azzam-EI, deToledo-SM, Gooding-T, Little-JB; Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles; 1998; Radiat. Res.; 150; 497-504

Bankers-Fulbright-JL, Kalli-KR, McKean-DJ; Interleukin-1 Signal Transduction; 1996; Life Sciences; 59; Nr.2; 61-83

Böl-GF, Kreuzer-OJ, Brigelius-Flohé; Translocation of the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) into the nucleus; 2000; FEBS Letters; 477; 73-78

Bron-C, MacDonald-HR; Identification of the plasma membrane receptor for interleukin-1 on mouse thymoma cells; 1987; FEBS Letters; 219; Nr.2; 365-8

Burns-K, Martinon-F, Esslinger-C, Phal-H, Schneider-P, Bodmer-J-L, DiMarco-F, French-L, Tschopp-J; MyD88, an Adapter Protein Involved in Interleukin-1 Signaling; 1998; J. Biol. Chem.; 273; Nr. 20; 12203-9

Burns-K, Clatworthy-J, Martin-L, Martinon-F, Plumpton-C, Maschera-B, Lewis-A, Ray-K, Tschopp-J, Volpe-F; Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor; 2000; Nat. Cell Biol.; 2; Nr. 6; 346-51

Cao-Z, Henzel-WJ, Gao-X; IRAK: A Kinase Associated with the Interleukin-1 Receptor; 1996; Science; 271; 1128-31

Cao-Z, Xiong-J, Takeuchi-M, Kurama-T, Goeddel-DV; TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1; 1996b; Nature; 383; 443-6

Celenza-JL, Carlson-M; A Yeast Gene That Is Essential for Release from Glucose Repression Encodes a Protein Kinase; 1986; Science; 233; 1175-1180

Chaga-G, Andersson-L, Ersson-B, Porath-J; Purification of Two Muscle Enzymes by Chromatography on Immobilized Ferric Ions; 1989; Biotechnology and Applied Biochemistry; 11; 424-31

Chen-RF, Knutson-JR; Mechanism of Fluorescence Concentration Quenching of Carboxyfluorescein in Liposomes: Energy Transfer to Nonfluorescent Dimers; 1988; Anal. Biochem.; 172; 61-77

COPE siehe Ibelgauff-H

Cooper-JA; Estimation of Phosphorylation Stoichiometry by Separation of Phosphorylated

Isoforms; 1991; Methods of Enzymology; 201; 251-60

Croston-GE; Cao-Z, Goeddel-DV; NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity; 1995; J. Biol. Chem.; 270; 16514-17

deMoreno-MR, Smith-JF, Smith-RV; Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels: Increased Sensitivity through a Combined Coomassie Blue-Silver Stain Procedure; 1985; Anal. Biochem.; 151; 466-70

deToledo-SM, Azzam-EI, Keng-P, Laffrenier-S, Little-JB; Regulation by ionizing radiation of CDC2, cyclin A, cyclin B, thymidin kinase, topoisomerase IIalpha, and RAD51 expression in normal human diploid fibroblasts is dependent on p53/p21 Waf1; 1998; Cell Growth Differ.; 9; 887-96

Dinarello-CA; Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism; 1991; Blood; 77; Nr.8; 1627-52

Dinarello-CA; The interleukin-1 family: 10 years of discovery; 1994; The FASEB Journal; 8; 1314-25

Dinarello-CA; Interleukin-1; 1997; Cytokine & Growth Factor Reviews; 8; Nr.4; 253-65

Engelhardt-H, Beck-W, Schmitt-T; Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten; 1994; Vieweg Verlag

Frank-R; Spot-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Adressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support; 1992; Tetrahedron; 48; Nr. 42; 9217-32

Gast-R; Entwicklung einer neuen Methode zur Aufklärung der Peptidsubstrat-Spezifität von Proteinkinasen; Beiträge zur Synthese von Difluormethylphosphonat-Derivaten von Phosphoserin; 1999; Dissertation; GBF Braunschweig

Gast-R, Glökler-J, Höxter-M, Kieß-M, Frank-R, Tegge-W; Method for Determining Protein Kinase Substrate Specificities by the Phosphorylation of Peptide Libraries on Beads, Phosphate-Specific Staining, Automated Sorting, and Sequencing; 1999; Anal Biochem.; 276; Nr. 2; 227-241

Goheer-MA, Gould-BJ, Parke-DV; Preparation of immobilized baker's-yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase attached to modified sepharose and sephadex and a comparison of the properties of these preparations with those of the soluble enzyme; 1976; Biochem. J.; 157; Nr. 2; 289-94

Ghosh-SS, Musso-GF; Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports; 1987; Nucleic Acids Research; 15; No. 13; 5353-72

Greenfeder-SA, Nunes-P, Kwee-L, Labow-M, Chizzonite-RA, Ju-G; Molecular Cloning and Characterization of a Second Subunit of the Interleukin 1 Receptor Complex; 1995; J. Biol. Chem.; 270; Nr. 23; 13757-65

Grenfell-JG, Smithers-N, Solari-R; Acute upregulation of interleukin-1 receptor by ligand; Cytokine; 1992; 4; Nr.2; 114-24

Guy-GR, Philip-R, Tan-YH; Analysis of cellular phosphoproteins by two-dimensional gel

electrophoresis: Applications for cell signalling in normal and cancer cells; 1994; Electrophoresis; 15; 417-40

Haugland-RP; Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals; 1996; Sixth Edition; Molecular Probes

Hartmeier-W; Immobilisierte Biokatalysatoren; 1986; Springer-Verlag

Haupt-K, Roy-F, Vijayalakshmi-MA; Immobilized Metal Ion Affinity Capillary Electrophoresis of Proteins - A Model for Affinity Capillary Electrophoresis Using Soluble Polymer-Supported Ligands; 1996; Anal. Biochem.; 234; 149-54

Holtzhauer-M; Biochemische Labormethoden; 1995; 2. Auflage; Springer Verlag

Ibelgaufft-H; Dictionary of Cytokines; VCH 1995 - siehe auch: (1999) <http://www.copewithcytokines.de>

Immler-D, Gremm-D, Kirsch-D, Spengler-B, Presek-P, Meyer-HE; Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS); 1998; Electrophoresis; 19; 1015-23

Johnson-LN, Barford-D; The Effects of Phosphorylation on the Structure and Function of Proteins; 1993; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.; 22; 199-232

Johnston-RF, Pickett-SC, Barker-DL; Autoradiography using storage phosphor technology; 1990; Electrophoresis; 11; Nr. 5; 355-60

Jungblut-PR, Zimny-Arndt-U, Zeindl-Eberhart-E, Stulik-J, Koupilova-K, Pleißner-K-P, Otto-A, Müller-E-C, Sokolowska-Köhler-W, Grabher-G, Stöffler-G; Proteomics in human disease: Cancer, heart and infectious diseases; 1999; Electrophoresis; 20; 2100-10

Kellner-R, Lottspeich-F, Meyer-HE; Microcharacterization of Proteins; 1999; 2nd Edition; Wiley-VCH

Klose-J, Kobalz-U; Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome; 1995; Electrophoresis; 16; 1034-59

Knop-J, Martin-MU; Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity; 1999; FEBS Letters; 448; 81-85

Korherr-C, Hofmeister-R, Wesche-H, Falk-W; A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signalling; 1997; Eur. J. Immunol.; 27; 262-7

Koz-LM, Rossomando-AJ, Weber-MJ; Comparison of Three Methods for Detecting Tyrosine-Phosphorylated Proteins; 1991; Methods in Enzymology; 201; 28-43

Kraus-G; Biochemie der Regulation und Signaltransduktion; 1997; VCH-Verlag

Kucerova-Z; Fractionation of human gastric proteinases by immobilized metal chelate (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography; 1989; Journal of Chromatography.; 489; 390-93

Kumar-S, McDonnell-PC, Lehr-R, Tierney-L, Tzimas-MN, Griswold-DE, Capper-EA, Tal-Singer-R, Wells-GI, Doyle-ML, Young-PR; Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family; 2000; J. Biol. Chem.; 275; Nr. 14; 10308-14

Landers-JP; Handbook of Capillary Electrophoresis; 1994; CBC Press Inc.

Lehninger-AL, Nelson-DL, Cox-MM; Prinzipien der Biochemie; 1994; 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH

Lewis-C, Mazzei-G, Shaw-A; Monoclonal antibodies reacting with the interleukin 1 receptor define a multi-molecular complex; 1990; Eur. J. Immunol.; 20; 207-213

Lindner-P, Guth-B, Wülfing-C, Krebber-C, Steipe-B, Müller-F, Plückthun-A; Purification of Native Proteins from the Cytoplasm and Periplasm of Escherichia coli Using IMAC and Histidine Tails: A Comparison of Proteins and Protocols; 1992; METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 4; 41-56

Lottspeich-F, Zorbas-H; Bioanalytik; 1998; Spektrum Akademischer Verlag

Lottspeich-F; Proteomanalyse - ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen; 1999; Angew. Chem.; 111; 2630-2647

Lowenthal-JW, MacDonald-HR; Binding and internalization of interleukin-1 by T cells; 1986; J. Exp. Med.; 164; 1060-74

Malinkowsky-D, Lundkvist-J, Laye-S, Bartfai-T; Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor; 1998; FEBS Letters; 429; 299-302

Marmioli-S, Bavelloni-A, Faenza-I, Sirri-A, Ognibene-A, Cenni-V, Tsukada-J, Koyama-Y, Ruzzene-M, Ferri-A, Auron-PE, Toker-A, Maraldi-NM; Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I; 1998; FEBS Letters; 438; 49-54

Martin-M, Böhl-GF, Eriksson-A, Resch-K, Brigelius-Flohé-R; Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T-cells; Eur. J. Immunol.; 1994; 24; 1566-71

Martin-UM, Falk-W; The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction; 1997; Eur. Cytokine Netw.; 8; Nr. 1; 5-17

Medzhitov-R, Preston-Hurlburt-P, Kopp-E, Stadlen-A, Chen-C, Ghosh-S, Janeway-CA; MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways; 1998; Molecular Cell; 2; 253-58

Mitcham-JL, Sims-JE; IIP1: A novel human protein that interacts with the IL-1 Receptor; 1995; Cytokine; 7; 596 (abstract A6)

Muszynska-G, Andersson-L, Porath-J; Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate; 1986; Biochem.; 25; 6850-53

Muszynska-G, Dobrowolska-G, Medin-A, Ekman-P, Porath-JO; Model studies on iron(III) ion



affinity chromatography II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins; *J. of Chrom.*; 1992; 604; 19-28

Muzio-M, Ni-J, Feng-P, Dixit-VM; IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling; 1997; *Science*; 278; 1612-15

Muzio-M, Polentarutti-N, Facchetti-F, Peri-G, Doni-A, Sironi-M, Transidico-P, Salmona-M, Introna-M, Mantovani-A; Characterization of type II intracellular IL-1 receptor antagonist (IL-1ra3): a depot IL-1ra; *Eur. J. Immunol.*; 1999; 29; 781-88

Ninomiya-Tsuji-J; Kishimoto-K, Hiyama-A, Inoue-J-i, Cao-Z, Matsumoto-K; The kinase TAK1 can activate the NIK-I $\kappa$ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway; 1999; *Nature*; 398; 252-56

O'Farrell-PH; High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins; 1975; *J. Biol. Chem.*; 250; Nr. 10; 4007-21

O'Neill-LAJ; Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1; 1995; *Biochim. et Biophys. Acta*; 1266; 31-44

Packer-NH, Pawlak-A, Kett-WC, Gooley-AA, Redmond-JW, Williams-KL; Proteome analysis of glycoforms: A review of strategies for the microcharacterisation of glycoproteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 1997; *Electrophoresis*; 18; 452-60

Pierce; INDIA<sup>TM</sup> PhosphoProbe-HRP; Instructions 15166 und 15167

Posewitz-MC, Tempst-P; Immobilized Gallium(III) Affinity Chromatography of Phosphopeptides; 1999; *Anal. Chem.*; 71; 2883-92

Reddy-SA, Huang-JH, Liao-WS; Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin-1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in Nf $\kappa$ B and AP-1 activation; 1997; *J. Biol. Chem.*; 272; Nr. 46; 29167-73

Römpp; Lexikon Chemie; 1998; Georg Thieme Verlag

Roussou-I, Thireos-G, Hauge-BM; Transcriptional-Translational Regulatory Circuit in *Saccharomyces cerevisiae* Which Involves the GCN4 Transcriptional Activator and the GCN2 Protein Kinase; 1988; *Mol. and Cell. Biol.*; 8; Nr. 5; 2132-39

Sacht-G, Brigelius-Flohé-R, Kiess-M, Sztajer-H, Flohé-L; ATP-sensitive association of mortalin with the IL-1 receptor type I; 1999; *Biofactors*; 9; 49-60

Sefton-BM, Hunter-T, Beemon-K, Eckhart-W; Evidence That the Phosphorylation of Tyrosine Is Essential for Cellular Transformation by Rous Sarcoma Virus; 1980; *Cell*; 20; 807-16

Shibuya-H, Yamaguchi-K, Shirakabe-K, Tonegawa-A, Gotoh-Y, Ueno-N, Irie-K, Nishida-E, Matsumoto-K; TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- $\beta$  signal transduction; 1996; *Science*; 272; 1179-82



Sims-JE, Bird-TA, Mitcham-JL; IIP1: a Gap-like protein implicated in IL-1 signaling; 1996; Eur. Cytokine netw.; 7; 199 (abstract 119)

Sjöback-R, Nygren-J, Kubista-M; Absorption and fluorescence properties of fluorescein; 1995; Spectrochimica Acta Part A; 51; L7-L21

Songyang-Z, Blechner-S, Hoagland-N, Hoekstra-MF, Piwnicka-Worms-H, Cantley-LC; Use of an orientated peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases; 1994; Current Biology; 4; Nr. 11; 973-82

Steinberg-TH, Chernokalskaya-E, Berggren-K, Lopez-MF, Diwu-Z, Haugland-RP, Patton-WF; Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain; 2000; Electrophoresis; 21; 486-96

Sun-W-C, Gee-KR, Klaubert-DH, Haugland-RP; Synthesis of Fluorinated Fluoresceins; 1997; J. Org. Chem.; 19; 6469-75

Takaesu-G, Kishida-S, Hiyama-A, Yamaguchi-K, Shibuya-H, Irie-K, Ninomiya-Tsuji-J, Matsamoto-K; TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway; 2000; Mol. Cell; 5; Nr. 4; 649-58

Tegge-W, Frank-R; Determination of Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinase Substrate Specificity by the Use of Peptide Libraries on Cellulose Paper; 1995; Biochemistry; 34; 10569-77

Tegge-W, Gast-R, Glöckler-J; Verbindung zum Nachweis von Phosphatestern; 1998; Internationale Patentanmeldung; PCT/EP98/01689

von Tiedemann-B; Einsatz von Antikörpern zur Detektion von phosphorylierten Aminosäuren; 1996; Diplomarbeit; GBF Braunschweig

Vig-E, Green-M, Liu-Y, Donner-DB, Mukaida-N, Goebel-MG, Harrington-MA; Modulation of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1-dependent NF-B Activity by mPLK/IRAK; 1999; 274; Nr.19; 13077-84

Voet-D, Voet-JG; Biochemie; 1992; VCH-Verlag

Volpe-F, Clatworthy-J, Kaptein-A, Maschera-B, Griffin-A-M, Ray-K; The IL-1 receptor accessory protein is responsible for the recruitment of the interleukin-1 receptor associated kinase to the IL-1/IL-1 receptor I complex; FEBS Letters; 1997; 419; 41-44

Wesche-H, Henzel-WJ, Shillinglaw-W, Li-S, Cao-Z; MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex; 1997; Immunity; 7; 837-47

Wesche-H, Resch-K, Martin-MU; Effects of IL-1 receptor accessory protein on IL-1 binding; 1998; FEBS Letters; 429; 303-6

Wesche-H, Gao-X, Li-X, Kirschning-CJ, Stark-GR, Cao-Z; IRAK-M Is a Novel Member of the Pelle/Interleukin-1 Receptor-associated Kinase (IRAK) Family; 1999; J. Biol. Chem.; 274; Nr. 27; 19403-10

---

Westermeier-R; Electrophoresis in Practice; 1993; VCH-Verlag

Wilkins-MR, Williams-KL, Appel-RD, Hochstrasser-DF; Proteom Research: New Frontiers in Functional Genomics; Springer; 1997

Wilm-M, Mann-M; Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source; 1996; Anal. Chem.; 68; 1-8

Winzerling-JJ, Berna-P, Porath-J; How to Use Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography; 1992; METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 4; 4-13

Yabushita-Y; Studies on the properties of immobilized urokinase: effects of pH and temperature; 1988; Biotechnol. Appl. Biochem.; 10; Nr. 3; 294-300

Yamin-T-T, Miller-DK; The Interleukin-1 Receptor-associated Kinase Is Degraded by Proteasomes following Its Phosphorylation; 1997; J. Biol. Chem.; 272; Nr. 34; 21540-47